

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

Rhizobiaceae

молекулярная биология бактерий
взаимодействующих с растениями



Редакторы: Герман Снайнк, Адам Кондороши и Пауль Хукс

Русский перевод под редакцией И.А.Тихоновича и Н.А.Проворова

The Rhizobiaceae

Molecular Biology of Model
Plant-Associated Bacteria

Edited by

Herman P. Spaink

Leiden University,
Institute of Molecular Plant Sciences,
Clusius Laboratory,
Leiden, The Netherlands

Adam Kondorosi

CNRS, Institut des Sciences Vegetales,
Gif sur Yvette,
Cedex, France

and

Paul J.J. Hooykaas

Leiden University,
Institute of Molecular Plant Sciences,
Clusius Laboratory,
Leiden, The Netherlands



Kluwer Academic Publishers
Dordrecht/Boston/London

All Rights Reserved

© 1998 Kluwer Academic Publishers

Rhizobiaceae

**молекулярная биология бактерий
взаимодействующих с растениями**

Редакторы

Герман Спайнк

Адам Кондороши

Пауль Хукас

Русский перевод под редакцией

И. А. Тихоновича и Н. А. Проворова

Санкт-Петербург

2002



**Издание осуществлено при поддержке Российского фонда
фундаментальных исследований
по проекту N 01-04-62006**

Оглавление

Предисловие к английскому изданию	11
Предисловие переводчиков	13
Предисловие к русскому переводу	14
Глава 1. Молекулярная эволюционная систематика Rhizobiaceae. П. Ван Беркум, Б. Эрдли	15
I. Введение	16
II. Историческая перспектива	17
III. Подходы к определению таксономических отношений	17
IV. Методы определения филогенетического родства	18
V. Роды Rhizobiaceae	23
VI. Возможные альтернативные критерии вида	35
VII. Литература	37
Глава 2. Общая генетика. М. Хайнес, Т. Финан	41
I. Введение: странное “семейство”	41
II. Генетические карты и организация генома	42
III. Перенос генов и рекомбинация	50
IV. Векторы и другие генетические инструменты	53
V. Литература	57
Глава 3. Белки наружной мембраны. Б. Люгтенберг	63
I. Оболочка клеток грам-отрицательных бактерий	63
II. Наружная мембрана бактерий семейства Rhizobiaceae	65
III. Генетический контроль синтеза белков наружной мембраны	70
IV. Литература	71
Глава 4. Фосфолипиды и альтернативные мембранные липиды. О. Гейгер	73
I. Введение	74
II. Липидные компоненты	74
III. Генетический анализ метаболизма липидов	75
IV. Жирные кислоты Rhizobiaceae	75
V. Биосинтез жирных кислот	77
VI. Фосфолипиды у Rhizobiaceae	87
VII. Биосинтез фосфолипидов	87
VIII. Обмен фосфолипидов	91
IX. Регуляция биосинтеза фосфолипидов	91
X. Альтернативные мембранные липиды	93
XI. Амфифильные производные жирных кислот	96
XII. Перспективы	97
XIII. Литература	97

Глава 5. β-глюканы клеточной поверхности. М. Бридвелд, К. Дж. Миллер	101
I. Введение	101
II. Структурные характеристики циклических β -глюканов	101
III. Локализация циклических β -глюканов	103
IV. Биосинтез циклических β -глюканов	104
V. Роль циклических β -глюканов при гипоосмотической адаптации	108
VI. Циклические β -глюканы и бактериально-растительные взаимодействия	110
VII. Заключительные замечания и перспективы	114
VIII. Благодарности	115
IX. Литература	115
 Глава 6. Синтез экзополисахаридов. А. Беккер, А. Пюлер	119
I. Введение	119
II. Принципы структуры и биосинтеза экзополисахаридов ризобий	120
III. Генетика биосинтеза экзополисахаридов ризобий	124
IV. Функции экзополисахаридов ризобий в свободноживущем состоянии и их роль в образовании клубеньков	134
V. Заключение и перспективы	137
VI. Литература	138
 Глава 7. Липополисахариды и К-антигены: структура, биосинтез и функции. Э. Канненберг, Б. Реус, С. Форсберг, Р. Карлсон	143
I. Введение	143
II. Липополисахариды (ЛПС)	145
III. К-антигены	168
IV. Заключение	173
V. Благодарности	174
VI. Литература	174
 Глава 8. Почвенная биология Rhizobiaceae. М. Садовски, П. Грэм	179
I. Введение	179
II. Почвенные популяции ризобий и их разнообразие	180
III. Выживание ризобий в почве и ризосфере	182
IV. Влияние бобового хозяина на почвенные популяции ризобий	182
V. Влияние биотических и абиотических факторов на ризобии в почве	185
VI. Конкуренция в почве и ризосфере	188
VII. Литература	191
 Глава 9. Опины и опин-подобные молекулы, вовлеченные во взаимодействия растений с бактериями семейства Rhizobiaceae. И. Дессо, А. Пети, С.К. Фарранд, П.Д. Марфи	199
I. Введение	199
II. Формирование опиновой концепции	201
III. Опин-подобные молекулы в бобово-ризобияльном взаимодействии	203

IV.	Роль опинов во взаимодействии растений с агробактериями	208
V.	Опины как ключевые факторы в растительно-агробактериальном взаимодействии ...	218
VI.	Куда ведет “опиновый след”?	219
VII.	Благодарности	220
VIII.	Литература	221

Глава 10. Конъюгативные плазмиды и их перенос. С. К. Фарранд 225

I.	Введение	225
II.	Встречаемость трансмиссивных элементов в семействе Rhizobiaceae	226
III.	Конъюгативный перенос Ti-плазмид <i>Agrobacterium</i>	228
IV.	Регуляция конъюгативного переноса Ti-плазмид	236
V.	Характеристики конъюгативного переноса Ti-плазмид	248
VI.	Системы конъюгативного переноса других плазмид	251
VII.	Биологическое значение	253
VIII.	Благодарности	255
IX.	Литература	255

Глава 11. Прикрепление Rhizobiaceae к растительным клеткам. Э. Маттис, Я. Кайн 259

I.	Введение	259
II.	Методы	261
III.	Генетика адгезии бактерий	263
IV.	Адгезины бактерий	266
V.	Адгезины растений	268
VI.	Факторы среды	271
VII.	Заключение	272
VIII.	Литература	272

Глава 12. Онкогены агробактерий. А.Н. Биннс, П. Костантино 275

I.	Корончатые галлы и волосатые корни – болезни опухолевого (неопластического) роста ..	275
II.	Онкогены Т-ДНК	279
III.	Взаимодействие агробактериальных и растительных онкогенов	284
IV.	Заключительные замечания	288
V.	Литература	288

Глава 13. Организация и регуляция генов вирулентности *Agrobacterium*.

Т.М. Джонсон, А. Дас 291

I.	Введение	291
II.	Факторы, необходимые для переноса ДНК	291
III.	Регуляция <i>vir</i> -генов	293
IV.	Заключение	301
V.	Благодарности	301
VI.	Литература	301

Глава 14. Функции Vir-белков Ti-плазмид: формирование T-комплекса и перенос в растительную клетку. Ф. Круз, Э. Ланка	305
I. Введение	305
II. Перенос T-ДНК - особая форма бактериальной конъюгации	306
III. Образование T-нитей	310
IV. Активация T-нитей	312
V. VirB - транспортная структура	316
VI. Опероны <i>virE</i> и <i>virF</i>	322
VII. Аналогии с другими системами транспорта белков: перенос T-комплекса и конъюгация используют путь экспорта белков IV типа	323
VIII. Благодарности	324
IX. Литература	324
Глава 15. Функции белков вирулентности агробактерий в растении. Л. Росси, Б. Тинланд, Б. Хон	327
I. Введение	327
II. Процессинг T-ДНК	328
III. T-комплекс (T-ДНК+VirD2+VirE2)	330
IV. Перенос T-комплекса в ядро растительной клетки	333
V. Интеграция T-ДНК	336
VI. Горизонтальный перенос генов	337
VII. Перспективы исследований	339
VIII. Благодарности	341
IX. Литература	343
Глава 16. Факторы хозяйской специфичности <i>Agrobacterium</i>. В. Денг, Ю. Нестер	345
I. Введение	345
II. Ti-плазмиды и хозяйская специфичность	346
III. Хромосомные детерминанты хозяйской специфичности	353
IV. Растительные факторы, определяющие специфичность агробактерий	357
V. Агротрансформация однодольных и других устойчивых растений: проблемы и успехи ...	358
VI. Заключение	360
VII. Литература	360
Глава 17. Использование агробактерий в генной инженерии растений. К. Д'Халльон, Й. Боттерман	365
I. Введение	365
II. Векторные конструкции	365
III. Методы	366
IV. Преимущества агробактериальной трансформации по сравнению с прямым переносом генов	367
V. Молекулярное маркирование генов	367
VI. Гены-мишени. Направленный мутагенез	368
VII. Применение агробактериальной трансформации для получения генноинженерных растений с новыми признаками	368
VIII. Литература	370

Глава 18. Разнообразие процессов образования корневых клубеньков и их инфицирования ризобиями. А.-Е. Хадри, Г. Спайнк, Т. Бисселинг, Н. Бревин	373
I. Хозяйская специфичность ризобий	373
II. Эволюционное разнообразие процессов образования клубеньков	374
III. Сравнительная анатомия корневого клубенька	375
IV. Регуляция образования клубеньков растением	385
V. Благодарности	386
VI. Литература	386
Глава 19. Генетическая организация и транскрипционная регуляция генов ризобий, контролирующих образование клубеньков. Х. Шламан, Д. Филлипс, Е. Кондороши ..	389
I. Введение	389
II. Организация генов клубенькообразования	391
III. Промоторы, содержащие <i>nod</i> -box	392
IV. Транскрипционные регуляторы NodD и SyrM	396
V. Факторы, активирующие гены клубенькообразования	399
VI. Взаимодействие белков NodD с последовательностями <i>nod</i> -box	403
VII. Позитивная регуляция генов клубенькообразования	405
VIII. Негативная регуляция генов клубенькообразования	405
IX. Другие факторы, регулирующие гены клубенькообразования	407
X. Экспрессия генов клубенькообразования на поздних стадиях симбиоза	408
XI. Выводы и перспективы	409
XII. Благодарности	409
XIII. Литература	411
Глава 20. Функции ризобияльных генов клубенькообразования. Дж. А. Доуни	417
I. Введение	417
II. Биосинтез Nod-факторов	418
III. Модификации Nod-факторов, специфичные для разных клубеньковых бактерий	422
IV. Секреция Nod-факторов	427
V. Секреция белков	428
VI. Гены с неизвестными функциями	429
VII. Заключительные замечания	430
VIII. Благодарности	430
IX. Литература	431
Глава 21. Реакции растений на Nod-факторы. А.-Е. Хадри, Т. Бисселинг	435
I. Введение	435
II. Реакции, индуцируемые Nod-факторами	435
III. Структурно-функциональные отношения и механизмы рецепции Nod-факторов	444
IV. Ответы растений, сходные с защитными реакциями	447
V. Литература	448

Глава 22. Колонизация клеток и тканей <i>Rhizobium</i>: структура и развитие инфекционных нитей и симбиосом. Н. Бревин	451
I. Колонизация межклеточного пространства: образование инфекционных нитей	451
II. Эндоцитоз бактерий и дифференцировка бактериоидов	456
III. Симбиосомы и функции симбиосомной мембраны	458
IV. Выводы	462
V. Благодарности	462
VI. Литература	462
Глава 23. Контроль симбиотической фиксации азота ризобиями. П. Камински, Ж. Батут, П. Боистард	465
I. Введение	465
II. Синтез и активность нитрогеназы	466
III. Симбиотическая азотфиксация	471
IV. Регуляция генов азотфиксации	480
V. Заключение и перспективы	486
VI. Благодарности	488
VII. Литература	488
Глава 24. Метаболизм углерода и азота у ризобий. М. Кан, Т.Р. Макдермот, М.К. Удварди ..	493
I. Введение	493
II. Метаболизм углерода и азота у свободноживущих ризобий	494
III. Интеграция метаболизма бактериоидов и растительных клеток в клубеньках	501
IV. Выводы и перспективы	512
V. Литература	513
Глава 25. Эволюционные аспекты симбиотических адаптаций: вклад <i>Rhizobium</i> в эволюцию ассоциации. А. Квиспел	519
I. Введение	519
II. Эволюция симбиоза: от неустойчивых ассоциаций к эндоцитозу	520
III. Эволюция симбиоза: симбиосомы и органеллы	528
IV. Общие выводы и заключительные замечания	534
V. Литература	535
Глава 26. Симбиотическая азотфиксация у бобовых: сельскохозяйственные аспекты. К. Вэнс ...	541
I. Важность азотфиксации, происходящей в клубеньках бобовых	541
II. Симбиотическая азотфиксация	543
III. Селекция растений на повышение симбиотической активности	552
IV. Роль фиксированного азота в системах землепользования	554
V. Новые приложения азотфиксирующих систем	557
VI. Выводы	561
VII. Благодарности	561
VIII. Литература	561
Список авторов	565

Предисловие к английскому изданию

Предлагаемая книга содержит полный обзор современных молекулярно-биологических данных о Rhizobiaceae — наиболее изученном в настоящее время семействе почвенных бактерий. Уже несколько столетий они привлекают внимание ученых благодаря способности взаимодействовать с растениями и при этом специфически модифицировать их развитие. Некоторые из этих ассоциаций полезны для растений, что характерно для форм Rhizobiaceae, объединяемых в группу ризобий. Они способны фиксировать азот в симбиозе с растениями-хозяевами, что сопровождается формированием корневых или стеблевых клубеньков. В то же время, некоторые формы Rhizobiaceae отрицательно влияют на развитие растений, вызывая их заболевания. Примерами являются *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes*, которые индуцируют, соответственно, формирование корончатых галлов и бородатых корней. В дополнение к очевидной агрономической важности изучения Rhizobiaceae, оно затрагивает многие фундаментальные научные проблемы, которые освещены в нашей книге. Приведем три примера. 1) Открытие переноса ДНК из *Agrobacterium tumefaciens* в растительные клетки, который приводит к их генетической колонизации бактериями. 2) Открытие липо-хитиновых олигосахаридных и митогенетических сигнальных молекул. 3) Выяснение того, что симбиотическая ассоциация основана на молекулярном диалоге партнеров, который заключается в передаче сигнальных молекул и активации специфических генных систем и программ развития. Оказалось, что эти принципы важны и могут служить парадигмой при изучении ряда неродственных организмов, таких как дрожжи, позвоночные или ассоциации разных организмов. Молекулярно-генетическое изучение взаимодействия между растением-хозяином и бактериями дало новые методы для изучения развития растений и сигнальных молекул, путей их обмена и передачи. В дополнение к этим сигнальным молекулам, множество других факторов играет роль в обеспечении успешного взаимодействия с растениями-хозяевами. В нашей книге эти факторы обсуждаются специалистами, работающими в различных областях химии, биохимии, генетики и микробиологии. Однако, обобщение имеющихся данных не должно проводиться в ущерб доступности информации для читателей-неспециалистов. Поэтому наша книга пригодна и для образовательных целей, например, для студентов старших курсов, изучающих микробиологию и микробно-растительные взаимодействия. Рассматриваемая область знаний уже достаточно разработана для того, чтобы быть включенной в учебники по биологии и химии микроорганизмов. Редакторы книги благодарны авторам за подготовку прекрасных статей. Мы благодарны также Эмме Гроот за техническое редактирование и подготовку книги к печати.

Герман Спайнк, Адам Кондороши, Пауль Хукас

Предисловие переводчиков

Книга “Rhizobiaceae, молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями” подготовлена большим международным коллективом ведущих специалистов в области изучения микробно-растительных взаимодействий. Она обобщает накопленные к концу 20-го столетия знания о молекулярной биологии, генетике, физиологии, филогении и экологии этой важнейшей в научном и практическом отношении группы бактерий. Потребность в издании подобной книги в России очень велика, так как расширение фронта фундаментальных и прикладных исследований ризобий и агробактерий становятся все более актуальным. В то же время, отечественная литература по данной проблеме далеко не исчерпывает всего многообразия накопленных фактов и идей, что сдерживает дальнейшее развитие научно-исследовательских работ, их практическое использование, а также подготовку специалистов необходимого профиля. Надеемся, что книга будет полезна научным работникам, ведущим исследования в различных областях микробно-растительных взаимодействий, а также молекулярной биологии и генетики, микробиологии, экологии, почвоведения и физиологии растений. Большое количество информативных и обобщающих рисунков позволит использовать книгу как учебное пособие для подготовки студентов по соответствующим специальностям. При подготовке рисунков мы вносили минимальные изменения в их исходные варианты, оставляя в ряде случаев англоязычные написания ферментов и продуктов, многие из которых специфичны именно для бактерий сем. Rhizobiaceae.

Перевод подготовлен коллективом специалистов ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии и Санкт-Петербургского государственного университета, работающих в различных областях изучения ризобий и агробактерий. Главы 1, 2, 6, 7, 8, 10, 11, 18, 19, 22, 23, 25, 26 переведены Н.А. Проворовым, главы 20 и 21 — И.А. Тихоновичем, главы 3, 4, 5 и 24 — Л.В. Кравченко, главы 12 и 17 — Л.А. Лутовой, главы 15 и 16 — З.Б. Павловой, глава 9 — Л.Т. Ходжайовой, главы 13 и 14 — Т.В. Матвеевой. Рисунки подготовлены Н.И. Воробьевым. Мы признательны А.О. Овцыной, Т.В. Затовской и А.С. Боровкову за критические замечания, высказанные при прочтении переводов отдельных глав.

И.А. Тихонович, Н.А. Проворов

Предисловие к русскому изданию

Издание в России книги “Rhizobiaceae, молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями” следует считать знаменательным событием, которое свидетельствует об активном развитии работ по генетике микробно-растительных взаимодействий. Российские ученые имеют давние традиции исследований в данной области. Достаточно вспомнить труды С.Н.Виноградского, открывшего феномен микробиологической азотфиксации, К.С.Мережковского, впервые убедительно показавшего симбиогенную природу растительной клетки, а также М.С.Воронина, в числе первых представившего доказательства симбиотической природы клубеньков бобовых. В настоящее время в изучении микробно-растительных взаимодействий в России наметился новый подъем, в котором ключевую роль играет международное сотрудничество. Организация в России в будущем 2003 году 11-го Международного Конгресса по молекулярным микробно-растительным взаимодействиям подведет итоги этого сотрудничества и даст ему новые импульсы. Одним из видимых результатов международной кооперации в области изучения микробно-растительных взаимодействий и является публикация данного издания, перевод которого подготовлен коллективом специалистов Всероссийского НИИ сельскохозяйственной микробиологии и Санкт-Петербургского университета, уже много лет плодотворно работающих в данной области. Многочисленные работы, проведенные учеными этих учреждений в тесном взаимодействии с коллегами из Лейденского Университета (Нидерланды), Института изучения растений (CNRS, Франция) и ряда других мировых центров, специализирующихся в области изучения бактериальных симбионтов растений, цитируются в данной книге. Издание предназначено для широкого круга специалистов биологического и сельскохозяйственного профиля, однако я от имени авторского коллектива хотел бы адресовать ее молодежи, в руках которой будущее науки.

Герман Спайнк

Молекулярная эволюционная систематика Rhizobiaceae

Беркум ван П., Эрдли Б.

I.	Введение.....	16
II.	Историческая перспектива.....	17
III.	Подходы к определению таксономических отношений.....	17
IV.	Методы определения филогенетического родства.....	18
IV.A.	Мультилокусный электрофорез ферментов (MLEE).....	18
IV.B.	Анализ профилей, получаемых с помощью полимеразной цепной реакции (PCR) TM	18
IV.C.	Анализ профилей ДНК, получаемых путем рестрикции.....	19
IV.D.	Определение сходства путем реассоциации ДНК.....	21
IV.E.	Определение генетического сходства путем секвенирования генов.....	21
IV.E.1.	Гены 16S РНК малой субъединицы рибосомы.....	21
IV.E.2.	Гены 23S РНК большой субъединицы рибосомы.....	23
V.	Роды Rhizobiaceae.....	23
V.A.	Описание видов, относящихся к различным родам Rhizobiaceae.....	24
V.A.1.	<i>Agrobacterium</i> (Conn, 1942).....	24
V.A.2.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Smith, Townsend, 1907).....	25
V.A.3.	<i>Agrobacterium radiobacter</i> (Beijerinck, van Delden, 1902).....	26
V.A.4.	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> (Riker et al., 1930).....	26
V.A.5.	<i>Agrobacterium vitis</i> (Ophell, Kerr, 1990).....	26
V.A.6.	<i>Agrobacterium rubi</i> (Hildebrand, 1940).....	27
V.A.7.	Неклассифицированные виды <i>Agrobacterium</i>	27
V.A.8.	<i>Azorhizobium</i> (Dreyfus et al., 1988).....	27
V.A.9.	<i>Bradyrhizobium</i> (Jordan, 1982).....	28
V.A.10.	Симбионты сои, <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (Jordan, 1982) и <i>B. elkanii</i> (Kuykendall et al., 1992).....	28
V.A.11.	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> (Xu et al., 1995), дополнительный вид, нодулирующий сою.....	29
V.A.12.	Третий род <i>Rhizobium</i> , реклассифицированный как <i>Mesorhizobium</i> (Jarvis et al., 1997).....	29
V.A.13.	<i>Mesorhizobium loti</i> (Jarvis et al., 1982).....	29
V.A.14.	<i>Mesorhizobium huakuii</i> (Chen et al., 1991).....	30
V.A.15.	<i>Mesorhizobium ciceri</i> (Nour et al., 1994b) и <i>M. mediterraneum</i> (Nour et al., 1995) - виды, нодулирующие нут.....	30
V.A.16.	<i>Mesorhizobium tianshanense</i> (Chen et al., 1995).....	31
V.A.17.	<i>Phyllobacterium</i> (Knösel, 1962).....	31
V.A.18.	<i>Rhizobium</i> (Frank, 1889).....	31
V.A.19.	<i>Rhizobium leguminosarum</i> (Frank, 1889).....	32
V.A.20.	<i>Rhizobium tropici</i> (Martinez-Romero et al., 1991).....	32
V.A.21.	<i>Rhizobium etli</i> (Segovia et al., 1993).....	32
V.A.22.	<i>Rhizobium galegae</i> (Lindström, 1989).....	32
V.A.23.	<i>Rhizobium gallicum</i> и <i>R. giardinii</i> , два дополнительных вида, выделенных из клубеньков <i>Phaseolus vulgaris</i> (Amarger et al., 1997).....	33

V.A.24. <i>Rhizobium hainanense</i> (Chen et al., 1997).....	33
V.A.25. <i>Rhizobium mongolense</i> (van Berkum et al., 1997).....	33
V.A.26. " <i>Rhizobium lupini</i> " (Schroetd., 1886; Eckhardt et al., 1931).....	33
V.A.27. <i>Sinorhizobium</i> (De Lajudie et al., 1994).....	34
V.A.28. <i>Sinorhizobium meliloti</i> (Dangeard, 1926).....	34
V.A.29. <i>Sinorhizobium medicae</i> (Rome et al., 1996b).....	34
V.A.30. <i>Sinorhizobium fredii</i> (Scholla, Elkan, 1984).....	35
V.A.31. <i>Sinorhizobium saheli</i> (De Lajudie et al., 1994).....	35
V.A.32. <i>Sinorhizobium teranga</i> (De Lajudie et al., 1994).....	35
VI. Возможные альтернативные критерии вида.....	35
VII. Литература.....	37

I. Введение

Семейство растений Fabaceae (бобовые) подразделяется на три подсемейства, Mimosoideae, Caesalpinioideae и Papilionoideae, содержащие 674 рода (Gunn et al., 1992) и 16000-19000 видов (Allen, Allen, 1980). Бобовые распространены по всему миру и по экономическому значению занимают второе место после злаковых. Уникальным свойством бобовых является формирование корневых клубеньков, которые описали еще в 16 веке, а в 19 веке стали считать диагностическим признаком этих растений. Однако не все бобовые образуют клубеньки, а большинство видов даже не исследовано в этом отношении. В наиболее примитивном подсемействе Caesalpinioideae лишь немногие виды (23% от изученных) образуют клубеньки, однако это свойство характерно для большинства видов Mimosoideae и Papilionoideae (90% и 97% от изученных видов, соответственно), которые, как полагают, произошли от Caesalpinioideae (de Faria et al., 1984, 1987, 1989; Polhill et al., 1981).

Образование клубеньков и последующее развитие азотфиксирующего симбиоза у бобовых происходит в ответ на инфицирование бактериями нескольких родов, относящихся к семейству Rhizobiaceae (Сопн, 1938). В природе эти растительные симбионты играют важную роль как поставщики связанного азота. Для человека они имеют практическое значение, заключающееся в повышении продуктивности растений и сохранении ресурсов окружающей среды. Однако не все представители Rhizobiaceae являются полезными. Некоторые виды *Agrobacterium* вызывают болезни растений, выявляемые по присутствию корончатых галлов или по разрастаниям корней. Представители рода *Phyllobacterium* образуют на листьях растений семейств Myrsinaceae и Rubiaceae клубеньки, значение которых пока неясно. Способность вызывать новообразования у растений считается основной характеристикой Rhizobiaceae (Knösel, 1962).

Изучение бактерий имеет большое значение для гигиены, медицины, сельского хозяйства и пищевой промышленности. Бактериология как наука отделилась от ботаники и создала основу для развития микробной систематики, практическими задачами которой является описание и идентификация штаммов. Систематика разрабатывает методы и принципы классификации и номенклатуры, которые в случае бактерий основаны на фенотипических (морфо-физиологических) и генетических (структура ДНК и генных продуктов) признаках. Результатами такой характеристики являются классификационные схемы, которые, по крайней мере, в некоторых случаях, отражают естественные эволюционные отношения. Сравнительный анализ ДНК и генных продуктов (молекулярная систематика) может быть использован для развития филогенетических систем классификации. Таксономия есть теория и практика классификации различных групп, используемая для целей идентификации.

Основной целью молекулярной эволюционной систематики является реконструкция эволюционного процесса и молекулярно-генетическое изучение разнообразия природных популяций. Именно в поиске эволюционных отношений молекулярная систематика опережает таксономию, которая направлена на классификацию и описание видов. Филогения группы организмов традиционно изображается в форме иерархического "древа", отражающего возможные эволюционные отношения. Обычно каждая прогрессивная группа в таксономической иерархии представлена кла-

стером родственных таксонов. Таксон называют монофилетичным, если он произошел от одной предковой популяции. Если представители таксона произошли от двух или более предковых популяций, то таксон считают полифилетичным. Хотя в систематике бактерий имеется много противоречий, связанных с определением вида, обычно видом называют монофилетичную или близкую к ней единицу. Это означает, что большая часть ДНК у представителей одного вида должна происходить от единого предка.

II. Историческая перспектива

Первым, кто выделил бактерии из клубеньков в чистую культуру, был М. Бейеринк, назвавший их *Bacillus radicola*. Таксономия этих симбионтов и количество видов дискутировалась в течение 30 лет (Fred et al., 1932). Frank назвал клубеньковые бактерии *Rhizobium leguminosarum*, а к 1929 году было признано существование 6 видов: *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum*, *R. lupini* (Fred et al., 1932). Для их идентификации использовали главным образом способность формировать клубеньки на корнях определенных видов бобовых (группы перекрестной инокуляции).

В 1940-х г.г. выделение новых видов ризобий на основе групп перекрестной инокуляции было остановлено тем, что выявились многочисленные случаи перекрывания данных групп (Wilson, 1944). Поэтому систематики бактерий стали обращать большое внимание на скорость роста, продукцию кислот, серологию, соотношение оснований ДНК, нумерическую таксономию, гибридизацию ДНК и чувствительность к фагам (Burton, 1979). Однако таксономическая классификация симбионтов бобовых, принятая в 1929 году, формально признавалась и сохранялась в списке признанных видов бактерий до 1980 года (Skerman et al., 1980).

Бактерии, индуцирующие корончатые галлы, были выделены в 1907 году и названы *Bacterium tumefaciens* (Smith, Townsend, 1907). Conn (1942) показал, что почвенные бактерии, классифицированные как *Alcaligenes radiobacter* и впервые выделенные в 1902 году (Beijerinck, van Delden, 1902), сходны с бактериальными симбионтами бобовых и близки к бактериям, образующим корончатые галлы и получившим к тому времени название *Phytomonas*. Основываясь на сходстве морфо-физиологических свойств, Conn (1942) предложил новое родовое название *Agrobacterium*, включив сапрофиты и патогены в типовой вид *A. tumefaciens*. Кроме того, он поместил в этот род почвенных сапрофитов *A. radiobacter*, а также бактерии *A. rhizogenes*, вызывавшие у растений синдром “волосатого корня”. В окончательный список бактерий (Skerman, 1980) вошел и вид *A. rubi* (Starr, Weiss, 1943), выделенный из стеблевых опухолей *Rubus* и первоначально названный *Phytomonas rubi* (Hildebrand, 1940).

Окончательный список не содержал рода *Phyllobacterium*, представители которого вызывают гипертрофии на листьях растений семейств Myrsinaceae и Rubiaceae. Однако Knösel (1984) пересмотрел классификацию, предложенную в определителе бактерий Берги, и предложил включить два вида, *P. myrsinacearum* и *P. rubiacearum*, в семейство Rhizobiaceae, что было обосновано результатами гибридизации ДНК и рРНК (Gillis, de Ley, 1980).

В этой главе мы в основном рассмотрим развитие исследований по молекулярной эволюционной систематике Rhizobiaceae с момента опубликования окончательного списка названий видов (Skerman et al., 1980). Превосходный обзор работ о популяционной генетике и филогеографии Rhizobiaceae (Martinez-Romero, Caballero-Mellado, 1996) позволяет нам не рассматривать подробно эти вопросы.

III. Подходы к определению таксономических отношений

Классификация, номенклатура и идентификация являются взаимосвязанными областями таксономии. Классификация осуществляет распределение организмов по таксономическим группам в соответствии с их сходством. Номенклатура дает таксономическим группам названия в соответствии с международными правилами. Идентификация — это процесс определения того, в какую из выявленных ранее групп входит новый изолят. У многих высших организмов эти подходы

частично базируются на использовании ископаемых остатков, что обеспечивает возможность филогенетической классификации, которая может существенно отличаться от классификации, построенной с учетом только фенотипических признаков.

Ранние работы по классификации бактерий основывались в основном на морфологических и физиологических признаках и на методиках изучения чистых культур. Хотя ископаемые остатки и известны для некоторых микробов, они оказались мало пригодными для построения филогении. Однако в последние 20 лет возможности для построения филогении бактерий существенно расширились в связи с использованием методов определения генетического родства. Поэтому для выяснения перспектив построения молекулярной эволюционной систематики *Rhizobiaceae* мы дадим краткий обзор этих методов.

IV. Методы определения филогенетического родства

IV.A. МУЛЬТИЛОКУСНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ФЕРМЕНТОВ (MLEE)

Генетическое расстояние между индивидами можно оценить, сравнивая варьирование аллелей нескольких консервативных генов. При использовании мультилокусного электрофореза ферментов родство штаммов определяется по сравнительной подвижности нескольких метаболически важных водорастворимых ферментов. Одно из преимуществ этого подхода состоит в том, что он опирается на полиморфизм по ряду хорошо изученных локусов, последовательности которых вместе составляют несколько тысяч нуклеотидных пар, разбросанных по геному. Однако, этот метод регистрирует только те различия, которые основаны на заменах аминокислот, имеющих разный заряд, что не позволяет получать полную информацию о генетической изменчивости. Несмотря на это и в отличие от многих других методов, используемых в бактериальной систематике, MLEE позволяет получать информацию о генетическом варьировании внутри видов. Эта информация позволяет судить о генетической структуре природных популяций, а также об эволюционной роли естественного отбора, генетического дрейфа, мутаций и горизонтального переноса генов (Selander et al., 1994). В литературе описаны общие принципы этого метода (Selander et al., 1986), а также возможность его использования в изучении ризобий (Eardly et al., 1994).

MLEE был использован во многих работах по изучению *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* (Young, 1985; Young et al., 1987; Young, Wexler, 1988; Pinero et al., 1988; Harrison et al., 1989; Engvild et al., 1990; Eardly et al., 1990, 1995; Segovia et al., 1991; Martinez-Roimero et al., 1991; Demezas et al., 1991, 1995; Souza et al., 1992, 1994; Bottomley et al., 1994; Leung et al., 1994; Nour et al., 1994; Strain et al., 1994, 1995; Gordon et al., 1995; van Berkum et al., 1995; Sullivan et al., 1996). В то же время, нам не известны случаи использования этого метода для изучения *Agrobacterium* и *Phyllobacterium*. Результаты использования MLEE для изучения ризобий, полученные до 1995 года, суммированы в обзоре (Martinez-Romero, Caballero-Mellado, 1996). В целом полученные данные показывают, что популяции ризобий чрезвычайно разнообразны по сравнению с популяциями многих бактериальных патогенов животных. Однако, как и у патогенов животных, многие популяции у ризобий имеют клональную структуру, то есть рекомбинационные события в них происходят редко. Проявление клональности у многих видов (например, у *S. meliloti*) может быть связано с их полифилетичностью (Eardly et al., 1990; Maynard Smith et al., 1993).

IV.B. АНАЛИЗ ПРОФИЛЕЙ ДНК, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (PCR)TM

Фрагменты ДНК с различной молекулярной массой синтезируются с изучаемого образца ДНК с использованием или искусственных праймеров, или праймеров, гомологичных консервативным бактериальным генам. Этот подход опирается на различия между геномами по относительной локализации мишеней для праймеров, что приводит к амплификации продуктов с различной

молекулярной массой. Случайные праймеры могут быть использованы для изучения варьирования симбионтов бобовых (Dooley et al., 1993; Selenska-Pobell et al., 1995; van Rossum et al., 1995) с использованием метода случайных амплифицированных полиморфных ДНК (RAPD — от англ. Random Amplified Polymorphic DNA). Еще более широко используется анализ с помощью праймеров на консервативные последовательности, имеющиеся в бактериальных геномах (Veraslovic et al., 1991, 1994; de Bruijn, 1992; Judd et al., 1993; Leung et al., 1994; Nick, Lindstrom, 1994; van Berkum et al., 1994; Selenska-Pobell et al., 1995). Они включают пары праймеров для амплификации районов ДНК между повторяющимися экстрагенными палиндромами (REP, от англ. Repetitive Extragenic Palindrome) и повторяющимися межгенными консенсусами энтеробактерий (ERIC — от англ. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), а также единичными праймерами для BOX-последовательностей (Stern et al., 1984; Hilton et al., 1991; Martin et al., 1992). Путем полимеразной цепной реакции (PCR), профили фрагментов ДНК могут быть получены с помощью праймеров, гомологичных спейсерному району между генами рРНК для малой (SSU) и большой (LSU) субъединиц рибосомы (Jensen, Straus, 1993; Jensen et al., 1993).

Продукты амплификации разделяют в соответствии с молекулярной массой путем электрофореза в горизонтальном агарозном геле. Гель фотографируют и штаммы сравнивают по наличию или отсутствию определенных полос на треке. Это можно делать или визуальным, или сканируя изображение на компьютере с использованием специальных программ, после чего результаты парных сравнений используют для построения дендрограмм (Veraslovic et al., 1994). Для ризобий результаты применения REP и ERIC PCR хорошо совпадают с генетическими расстояниями, полученными с использованием MLEE (de Bruijn, 1992; Leung et al., 1994), что дает альтернативный или дополнительный подход для оценки генетического разнообразия.

Существенным ограничением методики PCR с использованием как случайных праймеров, так и праймеров, гомологичных определенным последовательностям, является идентичность каждого продукта по всем геномным образцам. Продукты идентичной молекулярной массы не должны представлять гомологичный район разных геномов, но могут иметь сходный размер благодаря простому совпадению. Отсутствие продукта также не является информативным, так как оно может быть связано либо с тем, что мишени, находящиеся поблизости, разделены, либо с тем, что одна или обе мишени отсутствуют. Поэтому дендрограммы, построенные с помощью результатов PCR, не всегда точно отражают различия между геномами, и методика пригодна главным образом для изучения варьирования внутри видов.

В случае амплификации спейсера между генами рРНК из малой и большой субъединиц рибосомы продукты амплификации включают одонитевые и гетеродуплексные ДНК (Jensen, Straus, 1993). Поскольку гетеродуплексные структуры содержат существенные участки одонитевых ДНК, их трудно использовать для идентификации, которая возможна лишь при высокой воспроизводимости опытов. Кроме того, присутствие гетеродуплексных структур ДНК, состоящих из одонитевых последовательностей разных локусов, может влиять на результаты картирования. Таким образом, важно быть уверенным в том, что гетеродуплексные структуры отсутствуют среди продуктов PCR или были удалены до электрофоретического разделения (Jensen, Straus, 1993).

IV.C. АНАЛИЗ ПРОФИЛЕЙ ДНК, ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ РЕСТРИКЦИИ

Для определения генетических расстояний на основе рестрикционного анализа имеется два основных подхода: обычный анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP — от англ.: Restriction Fragment Length Polymorphism) и PCR-RFLP. Для RFLP-анализа используют рестрикты тотальной ДНК, которые анализируют путем Саузерн-гибридизации со специфическими пробамми. При использовании PCR-RFLP специфические районы генома амплифицируют, а путем обработки рестриктазами и амплификации продуктов получают анализируемые профили. Профили полос, получаемые с использованием различных ферментов, используют для оценки генетического разнообразия. Однако вместо компьютерной обработки, основанной на использовании простых коэффициентов сходства (как в случае анализа данных PCR) результаты обрабатывают,

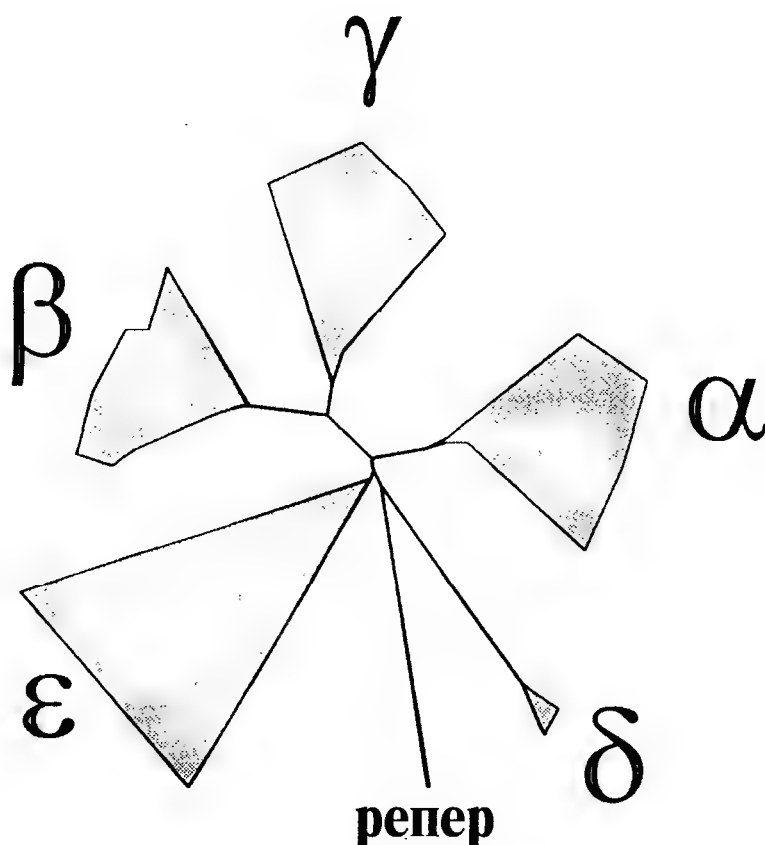


Рисунок 1. Филогения пурпурных бактерий (по данным анализа 16S рРНК). α-группа: *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Paracoccus denitrificans*, *Rickettsia rickettsi*; β-группа: *Alcaligenes eutrophus*, *Azoarcus indigens*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderia pickettii*, *Nitrosovibrio tenuis*, *Spirillum volutans*; γ-группа: *Legionella jamestowniensis*, *Oceanospirillum linum*, *Proteus vulgaris*, *Vibrio cholerae*; δ-группа: *Cystobacter fuscus*, *Mycococcus xanthus*; ε-группа: *Fucosobacterium russi*, *Helicobacter pylori*. В качестве репера использован *Streptomyces griseus*.

оценивая дивергенцию последовательностей в тех рестрикционных фрагментах, которые являются общими (Nei, Li, 1979). PCR-RFLP и ген рРНК малой субъединицы рибосомы были использованы при изучении симбионтов бобовых (Laguerre et al., 1994). Спейсер между генами рРНК для малой и большой субъединиц использовали для оценки различий между ризобиями нута (Nour et al., 1994a; 1994b, 1995).

Оба типа RFLP-анализа имеют определенные ограничения. Они учитывают дивергенцию лишь очень малых областей генома, которые могут не коррелировать с дивергенцией целых геномов. При гибридизации по Саузерну использование случайных клонов в качестве проб может давать слабые или не детектируемые ответы при исследовании ДНК неродственных штаммов. Кроме того, варьирование копийности генов также может влиять на определяемое генетическое расстояние. При использовании PCR-RFLP амплификация генов зависит от присутствия консервативных последовательностей на 5'- и 3'- концах. Оценка дивергенции последовательностей по профилям, полученным с использованием рестриков, может меняться благодаря присутствию полиморфных инсерционных последовательностей.

IV.D. ИЗУЧЕНИЕ СХОДСТВА ПУТЕМ РЕАССОЦИИИ ДНК

Измерение сходства геномов может быть основано на том, что двунитевые (нативные) ДНК диссоциируют на комплементарные нити при высокой температуре, а затем реассоциируют при понижении температуры. РНК обычно являются одонитевыми и могут спариваться с комплементарными цепями ДНК. Эксперименты по изучению гомологии нуклеиновых кислот позволяют выяснить, являются ли ДНК (или РНК) разных организмов достаточно сходными для того, чтобы сформировать гетеродуплексы или гетерологичные ДНК-РНК гибриды. Гомология ДНК позволяет измерить общее сходство геномов двух организмов. Рибосомные и транспортные РНК составляют лишь небольшую часть генома, и поэтому определяемые величины гомологии могут быть специфичными только для этих районов. Значения гомологии ДНК используются для определения различий между родственными организмами, тогда как гомология РНК позволяет оценивать сходство между удаленными организмами, так как рибосомные и транспортные РНК являются консервативными (Johnson, 1984).

Разработан ряд методов, которые базируются на мечении одного из образцов нуклеиновой кислоты (Johnson, 1984; Grimon, 1988). Хотя эти методы и дают сходные результаты, интерпретация получаемых величин гомологии является спорной. Предполагается (Johnson, 1984), что гомология ДНК внутри вида составляет 60-100%, причем гомология 60-70% характерна для разных подвидов. Величины гомологии 20-60% характерны для близкородственных видов.

Хотя изучение гомологии ДНК и дает количественную оценку генетического родства, использование этого подхода сталкивается с рядом серьезных проблем. Одна из них состоит в том, что многочисленные попарные сравнения большого числа штаммов весьма трудоемки. Полные матрицы расстояний не могут быть получены и существует большой разброс величин гомологии для близкородственных видов. Важная проблема заключается в том, что методика не является достаточно чувствительной для того, чтобы детектировать ограниченное число общих коротких последовательностей, возникающих в результате генетического обмена (Maynard Smith, 1995). При умеренных уровнях дивергенции ДНК гетеродуплексы не формируются и уровень гибридизации снижается до фонового уровня. Вклады плазмидной и хромосомной ДНК не могут быть разделены. Тем не менее, многие исследователи считают изучение гомологии ДНК наилучшей методикой для выяснения того, относятся ли два организма к одному виду. Ценность результатов, полученных путем анализа гомологии ДНК, подтверждается тем, что они совпадают с результатами анализа MLEE (Leung et al., 1994; Sullivan et al., 1996). Хотя идентификация и классификация нового вида должна быть подтверждена низкой гомологией ДНК с ранее описанными видами, важно уметь интерпретировать величины гомологии ДНК в контексте общей филогенетической информации (Maynard Smith, 1995).

IV.E. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО СХОДСТВА ПУТЕМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНОВ

IV.E.1. Гены 16S РНК малой субъединицы рибосомы

Наибольший прогресс в реконструкции филогении микроорганизмов был достигнут благодаря секвенированию генов рибосомных РНК (рис. 1). В частности, секвенирование рРНК малой субъединицы позволило пересмотреть взаимоотношения между разными бактериями (Olsen et al., 1994). На основе анализа этих последовательностей было показано, что семейство Rhizobiaceae входит в состав α -протеобактерий или пурпурных бактерий (Maidak et al., 1994). Эта группа включает 24 различных рода (Young, 1996). Члены Rhizobiaceae разделяются на несколько родов, которые не формируют кластера, отделенного от других родов α -протеобактерий (рис. 2).

Ген рРНК малой субъединицы рибосомы важен для оценки эволюционных отношений между бактериями, поскольку он эволюционирует медленно и его продукт жизненно важен и функционально консервативен. Несмотря на это, использование данного гена в качестве един-

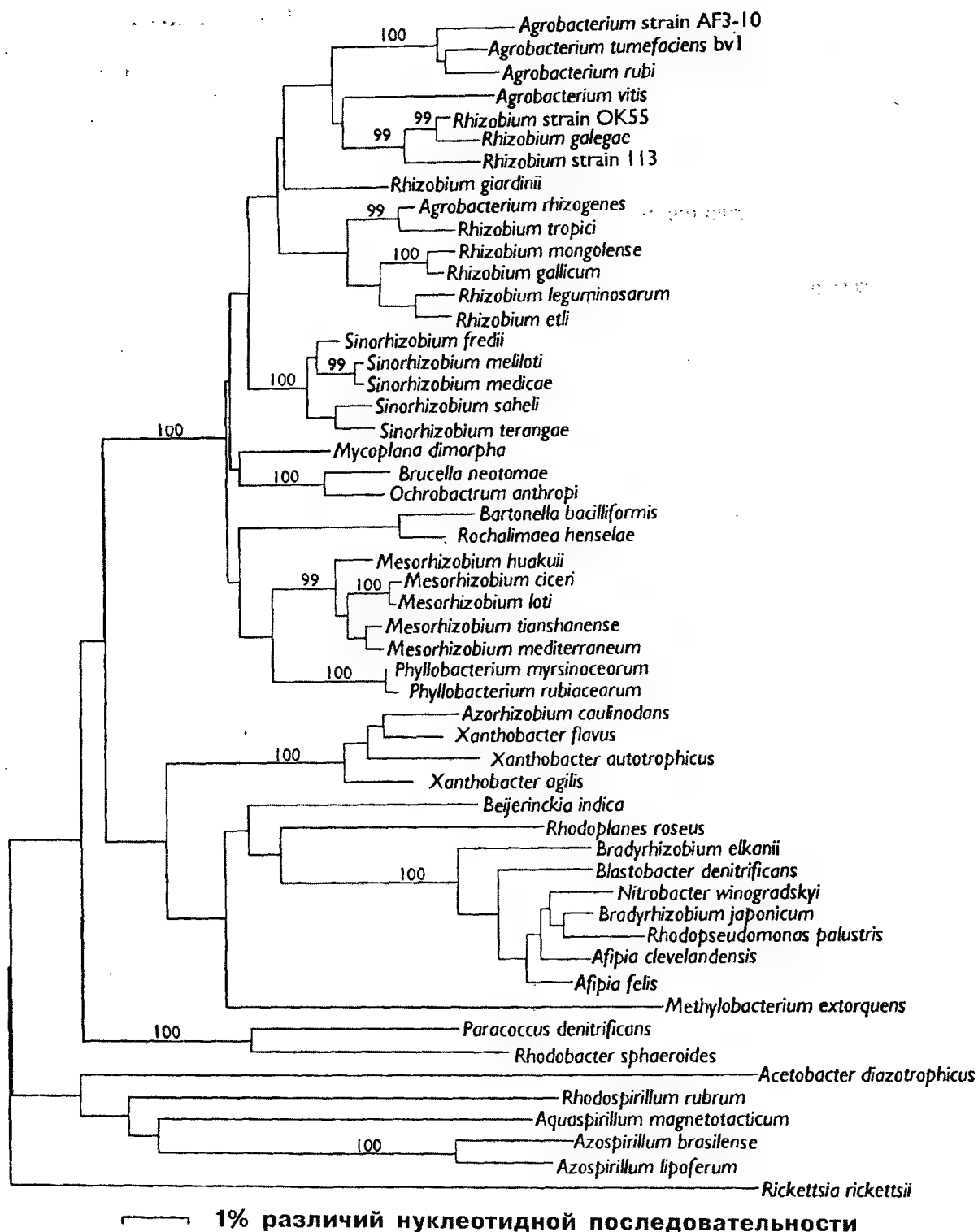


Рисунок 2. Филогения Rhizobiaceae и других представителей α -группы пурпурных бактерий (по данным анализа 16S рРНК).

ственного критерия филогенетического расстояния проблематично, особенно для близких таксонов. Так, сравнительный анализ структуры гена рРНК малой субъединицы в сочетании с анализом реассоциации общей ДНК у разных родов (*Fibrobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*) показал, что связь между получаемыми величинами не является линейной (Stackebrandt, Goebel, 1994). Отсутствие линейной связи между этими значениями показано и для представителей Rhizobiaceae (рис. 3). На основании этих данных сделан вывод о том, что использование гомологии генов рРНК малой субъединицы рибосомы в таксономических целях возможно лишь в том случае, если сходство менее 97% (Stackebrandt, Goebel, 1994). Эти авторы показали также, что гибридизация ДНК-ДНК дает наиболее значимые оценки сходства в том случае, когда гомология генов рРНК малой субъединицы рибосомы более 97%. Например, для различных видов *Bacillus*, разделенных с помощью метода ДНК-гибридизации, величины реассоциации генов рРНК малой субъединицы рибосомы оказались идентичными (Fox et al., 1992). Поэтому в случае гомологии генов рРНК малой субъединицы рибосомы свыше 97% определение границ вида возможно лишь при использовании данных о гибридизации ДНК-ДНК (Stackebrandt, Goebel, 1994).

IV.E.2. Гены 23S РНК большой субъединицы рибосомы

Топология филогенетического древа, отражающего отношения между 5 ветвями протеобактерий и полученного с использованием данных о гомологии генов рРНК малой субъединицы рибосомы, в целом были подтверждены при анализе рРНК большой субъединицы (Ludwig et al., 1995). Хотя последние гены не были широко использованы при изучении Rhizobiaceae, имеются данные о существенных различиях, которые могут быть использованы для классификации и идентификации. Участки этих генов, прилежащие к 5'-концу, могут содержать вариабильные структуры типа "стебель-петля" или промежуточные последовательности (IV), подверженные фрагментации *in vivo* при процессинге РНК-предшественника (Lessie, 1965; Marrs, Kaplan, 1970; Schuch, Loening, 1975; Mackay et al., 1979; Winkler, 1979; King et al., 1986; Burgin et al., 1990; Kordes et al., 1994). Показана центральная фрагментация рРНК большой субъединицы рибосомы, разделяющая молекулу на две части размером примерно по 1,3 т.п.н. В дополнение к центральной фрагментации, эта РНК у Rhizobiaceae фрагментируется вблизи 5'-конца, поскольку последовательность IV начинается со 130-й нуклеотидной позиции (Evgenieva-Hackenberg, Selenska-Pobell, 1995; Selenska-Pobell, Evgenieva-Hackenberg, 1995).

V. Роды Rhizobiaceae

Разделение родов *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*, различающихся по многим важным морфологическим и физиологическим свойствам, уже давно не вызывает сомнений (Jordan, 1984; Elkan, 1992). Симбионт, образующий клубеньки на стеблях *Sesbania rostrata* и обозначенный *Azorhizobium caulinodans*, резко отличается от *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* (Dreyfus et al., 1988). К настоящему времени в дополнение к этим родам в семействе Rhizobiaceae выделяли только роды *Agrobacterium* и *Phyllobacterium*. Однако стало очевидным, что имеется не менее трех генетических групп в пределах *Rhizobium*, которые предложено выделить в самостоятельные роды. Выделение рода *Sinorhizobium* (De Lajudie et al., 1994) подтверждено данными о гомологии генов рРНК малой субъединицы рибосомы. Было предложено и формально принято родовое название *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997). Ген рРНК малой субъединицы рибосомы для представителей разных родов Rhizobiaceae имеет гомологию 88-97% (табл. 1).

Генетическая информация, подтверждающая выделение 7 родов Rhizobiaceae, представляется убедительной за исключением одного вида *Rhizobium*. Вид *Rhizobium galegae* занимает особое филогенетическое положение по отношению к другим симбионтам бобовых, проявляя сходство лишь со штаммами SIN-1, OK55 и I13, выделенными из клубеньков *Sesbania aculeata* и *Mimosa invisa* (Sawada et al., 1993; Rana, Krishnan, 1995). Оказалось, что ближайшим родственником этого вида является *A. vitis* (Sawada et al., 1993), что вызвало дискуссию о возможности переноса *R. galegae* в род *Agrobacterium* (de Lajudie et al., 1994; Lindstrom et al., 1996; Young, 1996). Однако

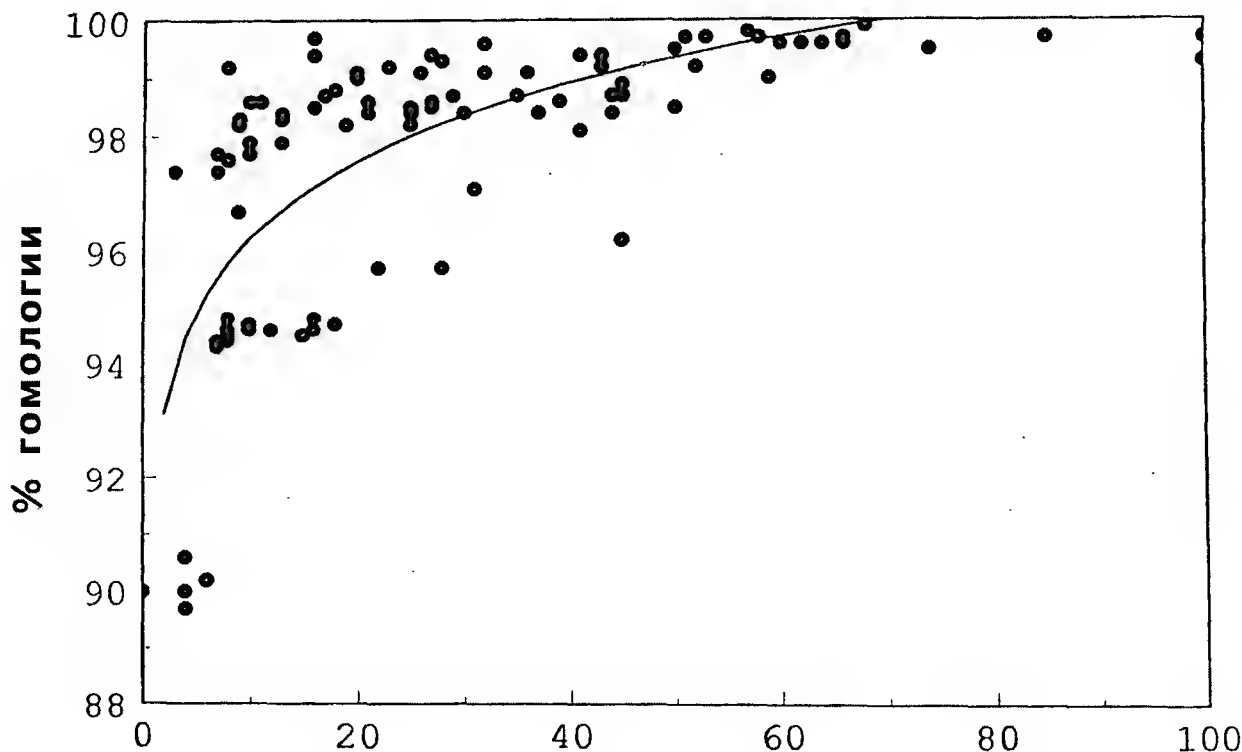


Рисунок 3. Сопоставление гомологии 16S рРНК и уровня реассоциации ДНК-ДНК у Rhizobiaceae (по данным работ: Hollis et al., 1981; Wedlock, Jarvis, 1986; Lindstrom, 1989; De Lajudie et al., 1994; Sullivan et al., 1996; van Berkum et al., 1996, 1997).

сравнение генов рРНК малой субъединицы рибосомы *R. galegae* и различных видов *Agrobacterium* показало, что *R. galegae* отличается от агробактерий не меньше, чем от ризобий (табл. 2). Поскольку сходство последовательностей 16S рРНК *R. galegae* и *Agrobacterium* такое же, как при сопоставлении других родов Rhizobiaceae, реклассификация *R. galegae* в род *Agrobacterium* пока не представляется оправданной. Однако по данным других работ филогенетическое положение этого вида ризобий по отношению к агробактериям оказалось близким. Вопрос может быть решен после идентификации в этой группе дополнительных видов и подтверждения их отношений данными о последовательностях ДНК в нескольких независимых локусах. Дополнительные данные требуются и для оценки возможности выделения *R. galegae* в отдельный род (Young, Naukka, 1996).

V.A. ОПИСАНИЕ ВИДОВ, ОТНОСЯЩИХСЯ К РАЗЛИЧНЫМ РОДАМ RHIZOBIACEAE

V.A.I. *Agrobacterium* (Conn, 1942)

Изначально виды *Agrobacterium* были классифицированы в соответствии с их фитопатогенностью, а также разделены на основании способности продуцировать 3-кетолактозу. Непатогенный вид был назван *A. radiobacter*, вид вызывающий синдром “волосатого корня” – *A. rhizogenes*, штаммы *A. rubi* формировали галлы на стеблях *Rubus*, *A. tumefaciens* – корончатые галлы на разных растениях (Skerman et al., 1980). Однако, *A. radiobacter* и *A. tumefaciens* не могли быть разделены

Таблица 1. Сходство нуклеотидных последовательностей генов рРНК малой рибосомы для различных родов Rhizobiaceae. Использованы последовательности *Phyllobacterium myrsinacearum* (IAM13584; D12789), *Mesorhizobium loti* (NZP22), *Sinorhizobium meliloti* (USDA1002; X67222), *Agrobacterium tumefaciens* биотип 1 (NCPPB2), *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (USDA2370; U29386), *Azorhizobium caulinodans* (ORS), *Bradyrhizobium japonicum* (USDA6; U69638)

Бактерии	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Azorhizobium</i>
<i>Phyllobacterium</i>	97.0	96.0	93.6	94.4	92.0
<i>Mesorhizobium</i>		95.9	93.6	94.4	91.4
<i>Sinorhizobium</i>			95.3	96.0	91.2
<i>Agrobacterium</i>				94.5	90.6
<i>Rhizobium</i>					91.4
<i>Azorhizobium</i>					

иначе как по патогенности (Holmes, 1988). Разделение *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* и *A. rubi* подтверждали данные нумерической таксономии (Holmes, Roberts, 1981), которые позволили выделить не получившую названия “желтую группу” *Agrobacterium*. Эта классификация игнорировала фитопатогенность как таксономический признак, так как образование корончатых галлов и “волосатых корней” кодируется плазмидными генами (Holmes, 1988). Плазмиды опухолообразования (pTi) и индукции “волосатых корней” (pRi) могут легко приобретаться и теряться, что приводит к нестабильности классификации видов, основанной только на патогенности. Классификация агробактерий была еще более затруднена предложениями о включении их в род *Rhizobium* (Moffett, Colwell, 1968). Хотя большая часть форм *Agrobacterium* в настоящая время и признается родом, отличающимся от *Rhizobium*, несколько штаммов, идентифицированных ранее как *Agrobacterium*, действительно проявляют свойства, которые говорят об их большем сходстве с *Rhizobium*.

Holmes (1988) показал существование 5 генетически различающихся групп *Agrobacterium*. Штаммы, принадлежащие к кластерам 1 и 2, определенным Kersters et al. (1973), штамм *A. rubi* NCPPB1650 и штамм NCPPB1771, имеют лишь 15% гомологии ДНК. Штаммы кластера 1 генетически гетерогенны и содержат по меньшей мере 7 групп, гомология ДНК между которыми составляет 45-50% (Kersters, DeLay, 1984). Они не получили отдельных названий по причине недостаточно подробной фенотипической охарактеризованности (Holmes, 1988). Однако, к ним не относятся штаммы биотипа 3, инфицирующие виноград (Kersters, De Ley, 1984). Возможно, что “желтая группа” штаммов вообще не принадлежит к роду *Agrobacterium* (Kersters, De Ley, 1984). Различия между изолятами могут быть выявлены с помощью PCR-RFLP анализа хромосомных и плазмидных локусов (Ponsonnet, Nesme, 1994).

V.A.2. *Agrobacterium tumefaciens* (Smith, Townsend, 1907)

Типовой штамм (ATCC23308, NCPPB2437) принадлежит к биотипу 1 и вызывает образование корончатых галлов. Штаммы этого вида отличаются от других видов *Agrobacterium* по фенотипическим свойствам (Holmes, Roberts, 1981), низкому уровню реассоциации ДНК-ДНК (Kersters, De Ley, 1984; Ophell, Kerr, 1990) и по последовательностям рРНК малой субъединицы рибосомы (Sawada et al., 1993; Willems, Collins, 1993). Вид включает ризогенные формы, представленные штаммом NCPPB2303, и к нему обычно относят бактерии, инфицирующие виноград (биотип 3), представленные штаммом NCPPB2562.

Таблица 2. Сходство нуклеотидных последовательностей рРНК малой субъединицы *Agrobacterium*, *Rhizobium leguminosarum* и *R. galegae* (Sawada et al., 1993)

Бактерии	<i>A. vitis</i>	<i>R. leguminosarum</i>	<i>R. g.</i>
<i>A. tumefaciens</i>	96.5	96.2	95.8
<i>A. rhizogenes</i>	95.8	98.6	95.8
<i>A. vitis</i>		94.8	95.8
<i>A. rubi</i>	96.8	95.1	95.8
<i>R. leguminosarum</i>	94.8		95.8
<i>R. galegae</i>	96.7	96.4	

V.A.3. *Agrobacterium radiobacter* (Beijerinck, van Delden, 1902)

Типовой штамм ATCC19358 также принадлежит к биотипу 1. Поскольку этот штамм имеет 80–87% гомологии ДНК с типовым штаммом *A. tumefaciens* (De Ley et al., 1973; Ophell, Kerr, 1990; Sawada et al., 1993), предполагается, что оба штамма принадлежат к одному виду и что типовым видом рода *Agrobacterium* должен быть признан *A. radiobacter*, а не *A. tumefaciens*. Последнее предложение разделяют и другие авторы (Bouzar, 1994; Oyaizi, Sawada, 1994). Биотип 2 представлен штаммом NCPPB2407. В вид *A. radiobacter* не было классифицировано ни одного штамма биотипа 3.

V.A.4. *Agrobacterium rhizogenes* (Riker et al., 1930)

Типовой штамм ATCC11325 принадлежит к биотипу 2 и отличается от других видов *Agrobacterium* по величинам реассоциации ДНК-ДНК (Kerstens, De Ley, 1984; Ophell, Kerr, 1990) и по нуклеотидным последовательностям рРНК малой субъединицы рибосомы (Sawada et al., 1993; Willems, Collins, 1993). Эти последовательности для нескольких неклассифицированных штаммов, K-AG-3 и Ch-Ag-4 составили 99.7% и 100% сходства с типовым штаммом. Однако, эти штаммы отличаются от *A. rhizogenes* фенотипически (Sawada, Ieki, 1992). Они могут быть отделены от типового штамма на основании сходства ДНК, что говорит о возможности выделения отдельного вида (Sawada et al., 1993). Другой вопрос, который необходимо решить в будущем, касается реклассификации штаммов K-Ag-3 и Ch-Ag-4 *A. rhizogenes* в род *Rhizobium*, поскольку последовательности рРНК малых субъединиц рибосом у них сходны с *R. tropici* (Young, 1996): гомология составляет 99.6–100% (Sawada et al., 1993). Основная проблема состоит в том, может ли сходство этих последовательностей служить единственным основанием для реклассификации агробактерий в *R. tropici*. Эта проблема не уникальна для агробактерий: она возникает также и при изучении *Phyllobacterium*, *Azorhizobium* и *Bradyrhizobium*.

V.A.5. *Agrobacterium vitis* (Ophell, Kerr, 1990)

Эти изоляты из растений винограда ранее были классифицированы как биотип 3 и включены в гетерогенную группу *A. tumefaciens* (Kerstens, De Ley, 1984). Типовой штамм NCPPB3554 может быть отделен от других видов *Agrobacterium* по биохимическим и серологическим свойствам. Низкие уровни гомологии ДНК (7–47%) с другими видами *Agrobacterium* (Ophell, Kerr, 1990) и сходство последовательностей рРНК малой субъединицы рибосомы на уровне 96.8% и 95.7% (Sawada et al., 1993) также говорят о видовой специфичности *A. vitis*.

V.A.6. *Agrobacterium rubi* (Hildebrand, 1940)

Эти агробактерии были выделены из стеблевых галлов *Rubus* spp., но их хозяйская специфичность не ограничена этими растениями. Типовой штамм ATCC13335 (NCPBB1854) может быть отделен от других видов *Agrobacterium* на основании гомологии ДНК (Kesters, De Ley, 1984; Ophell, Kerr, 1990) и последовательностей рРНК малой субъединицы рибосомы, гомологичных на 99.7% и 95.3% (Sawada et al., 1993; Willems, Collins, 1993). Только два дополнительных штамма считаются представителями этого вида.

V.A.7. Неклассифицированные виды *Agrobacterium*

Штаммы NCPBB1650, NCPBB1771, K-Ag-3, Ch-Ag-4 и AF3-10 генетически и фенотипически отличаются от типовых штаммов других видов *Agrobacterium*. NCPBB1650 и NCPBB1771 были изначально классифицированы как *A. rubi* на основании результатов нумерической таксономии (Holmes, Roberts, 1980) и обозначены как абберрантные штаммы *A. tumefaciens* (Kesters, De Ley, 1984). Штаммы K-Ag-3, Ch-Ag-4 и AF3-10 выделены из растений киви, вишни и *Ficus benjamina*, соответственно (Sawada, Ieki, 1992; Bouzar et al., 1995). Штаммы NCPBB1650, NCPBB1771, K-Ag-3 и Ch-Ag-4 имеют необычные фенотипические характеристики (Sawada, Ieki, 1992) и уровни реассоциации ДНК (Sawada et al., 1993). Штамм AF3-10 отличается от типовых штаммов по составу жирных кислот, способности к утилизации источников углерода и по необычному метаболизму опинов (Bouzar et al., 1995). Штаммы NCPBB1650 и NCPBB1771 сильно отличаются друг от друга, а также от типовых штаммов *Agrobacterium* по уровню реассоциации ДНК-ДНК (Kesters, De Ley, 1984). Показано, что штаммы K-Ag-3 и Ch-Ag-4 не отличаются от *R. tropici*, однако уровень реассоциации ДНК 24% позволяет отличить штамм Ch-Ag-4 от *R. tropici*, тип А (Martinez-Romero, 1994). Имеющаяся филогенетическая информация не позволяет объединять штаммы *Agrobacterium* и *Rhizobium* в один род (Sawada et al., 1993). Последовательности рРНК малой субъединицы рибосомы штаммов K-Ag-3 и Ch-Ag-4 сходны с типовым штаммом *A. rhizogenes* на 99.7% и 100%, соответственно. Для штамма NCPBB1650 и типового штамма *A. rubi* эти последовательности гомологичны на 99.7% (Sawada et al., 1993). Однако показано, что эти три штамма *Agrobacterium* должны быть отнесены к новому виду на основании фенотипических и генетических отличий от типовых штаммов. Штамм AF3-10 также было предложено выделить в новый вид *Agrobacterium* (Bouzar et al., 1995). Об этом говорит то, что сходство последовательностей рРНК малой субъединицы рибосомы AF3-10 со штаммами NCPBB1650, *A. tumefaciens*, *A. vitis* и *A. rhizogenes* составило 98.1%, 98.0%, 97.8%, 95.3% и 94.3%, соответственно; данные по реассоциации ДНК-ДНК пока отсутствуют.

V.A.8. *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988)

Sesbania rostrata — одно из немногих бобовых, образующих клубеньки на стеблях. Штаммы, выделенные из этих клубеньков, отличаются от других представителей Rhizobiaceae способностью к диазотрофному росту на безазотной среде (Dreyfus et al., 1983). Данные молекулярной систематики показали, что род *Azorhizobium* занимает особое место среди Rhizobiaceae (Dreyfus et al., 1988; Sawada et al., 1993; Willems, Collins, 1993). В нем выделен только один вид *A. caulinodans*, типовой штамм ORS571 (Dreyfus et al., 1988). На основании данных о реассоциации ДНК-ДНК род *Azorhizobium* может быть разделен на два геномных вида (Rinaudo et al., 1991), однако второй вид не получил отдельного названия в связи с отсутствием четких фенотипических отличий.

Azorhizobium весьма сходен с *Xanthobacter* по организации цистронов рРНК, которые классифицированы в единое семейство (Dreyfus et al., 1988). Тесное генетическое родство *Azorhizobium* и *Xanthobacter* подтверждается сходством рРНК малой субъединицы рибосомы на уровне 98.2% (Rainey, Wiegel, 1996). Это сходство не согласуется со статусом отдельных родов *Azorhizobium* и *Xanthobacter*, хотя анализ морфологических и биохимических свойств оправдывает такое разделение (Dreyfus et al., 1988). В то же время, данные молекулярной систематики могут быть интерпретированы и в пользу объединения родов *Azorhizobium*, *Xanthobacter* и *Aquabacter* в единый род *Xanthobacter* (Rainey, Wiegel, 1996).

V.A.9. *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982)

Bradyrhizobium четко отделяется от других симбионтов бобовых медленным ростом, способностью к подщелачиванию среды и отсутствием зоны свертывания на молоке с лакмусом. Этот род представляет весьма гетерогенную группу, таксономическое изучение которой происходит не так быстро, как для других ризобий. В этот род классифицировали симбионты сои (которые раньше обозначали *Rhizobium japonicum*) вместе с представителями разнородной группы ризобий вигны. Цистроны рРНК *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* различаются сильнее, чем для *Rhizobium* и других представителей Rhizobiaceae (Jarvis et al., 1986), что подтверждается анализом последовательностей рРНК малой субъединицы рибосомы (табл. 1). Возможно, что *Bradyrhizobium* произошли от фототрофов, о чем говорит сходство рРНК этих бактерий и *Rhodopseudomonas palustris* (Jarvis et al., 1986). Об этом говорят и результаты изучения штаммов *Bradyrhizobium*, выделенных из стеблевых клубеньков *Aeshynomene indica* (van Berkum et al., 1995). Несмотря на гетерогенность *Bradyrhizobium*, до сих пор идентифицируют всего два вида, *B. japonicum* и *B. elkanii*, являющиеся симбионтами сои, и имеются предложения о выделении третьего вида *B. liaoningense*.

V.A.10. Симбионты сои, *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982) и *B. elkanii* (Kuykendall et al., 1992)

Из-за медленного роста *Bradyrhizobium* его таксономическое изучение отставало от *Rhizobium*. Однако симбионты сои были исключением благодаря чрезвычайной важности данной бобовой культуры. Медленнорастущие симбионты классифицировали в 17 различных серогрупп (Date, Decker, 1965). Однако, эта классификация более подходила для штаммов выделенных в США, чем для штаммов из Юго-Восточной Азии (Thompson et al., 1991). Среди 28 штаммов идентифицировано 3 группы гомологии ДНК, из которых только одна выделена в Юго-Восточной Азии (Hollis et al., 1981). Группы I и Ia близки друг к другу, а группа II сильнее отличается от них по гомологии ДНК. В целом, наблюдается корреляция между разделением штаммов на серогруппы и группы гомологии ДНК: серогруппы 6, 38, 123 принадлежат к группе I, серогруппы 62 и 110 — к группе Ia, серогруппы 31, 46, 76 и 94 — к группе II. Гомология ДНК для других серогрупп пока не изучена. Дивергенция штаммов, относящихся к группам гомологии ДНК I и II, была подтверждена также результатами RFLP-анализа (Stanley et al., 1985; Kuykendall et al., 1992) и MLEE-анализа (Bottomley et al., 1994).

На основании этих различий, а также варьирования антибиотикоустойчивости, состава экзополисахаридов, жирных кислот и гемопротеинов, было предложено выделить группу гомологии ДНК II в отдельный вид, *B. elkanii* (Kuykendall et al., 1992). Кроме того, анализ жирных кислот и метиловых эфиров у штаммов, выделенных в Америке и Юго-Восточной Азии, показал наличие 4-й группы, отличающейся от групп I, Ia и *B. elkanii* (Graham et al., 1995). Анализ рРНК малой субъединицы рибосомы у медленнорастущих симбионтов сои показал наличие двух ветвей в роде *Bradyrhizobium*. Одна из них близка к *Rhodopseudomonas palustris* и содержит *B. japonicum*, а также представителей родов *Afipia*, *Nitrobacter* и *Blastobacter* (рис. 2). Пигментированные штаммы *Bradyrhizobium*, выделенные из *Aeshynomene indica*, также могут быть сближены с *R. palustris* (Young et al., 1991; Wong et al., 1994) на основании данных о последовательностях рРНК малой субъединицы рибосомы. Вторая ветвь содержит *B. elkanii* и штаммы *Bradyrhizobium*, выделенные из различных тропических бобовых.

Близкое генетическое родство *R. palustris*, *B. japonicum*, *Afipia*, *Nitrobacter* и *Blastobacter* (рис. 2) аналогично родству *Agrobacterium* с *Rhizobium*, *Phyllobacterium* с *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* с *Xanthobacter*. Однако, ситуация в роде *Bradyrhizobium* более сложна из-за сильной дивергенции *B. elkanii* и других брадиризов, выделенных из тропических бобовых. Относительное филогенетическое положение и тесное сходство некоторых представителей родов *Rhizobium* и *Agrobacterium* вызвало дискуссию о возможности реклассификации этих штаммов в другой род. Доводы в пользу такой реклассификации были использованы и при обсуждении таксономии *Bradyrhizobium*. При этом рассматривается возможность выделения *B. elkanii* в особый род. Это вопрос может быть решен после изучения нескольких разных генетических локусов.

V.A.11. Bradyrhizobium liaoningense (Xu et al., 1995), дополнительный вид, нодулирующий сою

Вид включает сверх-медленнорастущие симбионты сои, обитающие в почвах ряда провинций Китая (Liaoning, Heilongjiang, Shanxi, Hubei, Anhui). На основании анализа 17 изолятов по способности к утилизации источников углерода, устойчивости к антибиотикам и NaCl, росту при повышенной температуре, серологическим свойствам были показаны резкие отличия 16 из них от *B. japonicum*. Гомология ДНК этих изолятов с *B. japonicum* составила 9–38%, с *B. elkanii* – 7–30% (Xu et al., 1995). Данные о полных последовательностях рРНК пока не получены.

V.A.12. Третий род Rhizobium, реклассифицированный как Mesorhizobium (Jarvis et al., 1997)

Третий род ризобий характеризуется быстрым ростом и продукцией кислоты, благодаря чему его долгое время классифицировали вместе с *Rhizobium*. Для двух видов жгутикование является полярным или субполярным, что отличает их от перетрихального жгутикования других быстрорастущих ризобий. Другим отличительным свойством является локализация симбиотических генов в хромосоме, а не на плаزمиде (Pankhurst et al., 1983, 1986; Chua et al., 1985; Cadahia et al., 1986; Ruiz-Agüero et al., 1988). Выделение этой группы в особый род подтвердилось данными о гомологии ДНК (Crow et al., 1981) и генов рРНК малой субъединицы рибосомы (Sawada et al., 1993; Willems, Collins, 1993; Nour et al., 1995). Родовое название *Mesorhizobium* было предложено для того, чтобы отделить эти бактерии от двух других быстрорастущих ризобий (Jarvis et al., 1997). Это название отражает тот факт, что бактерии этого рода имеют скорость роста меньшую, чем у *Rhizobium*, но большую, чем у *Bradyrhizobium*. Однако замедленный рост характерен не для всех представителей *Mesorhizobium*. Так, скорость роста у *R. leguminosarum*, *S. meliloti* и симбионтов *Lotus* является сходной, что согласуется с данными о способности к продукции кислот (Martinez de Dretz, 1972; Jordan, 1984). Рост у штаммов, выделенных из нута, варьирует от медленного до быстрого (Ruiz-Agüero et al., 1988).

В настоящее время имеются предложения о выделении 5 видов этого рода: *M. loti*, *M. huakuii*, *M. ciceri*, *M. mediterraneum*, *M. tianshanense*. Штамм NZP2213, выделенный из *L. tenuis*, является типовым для данного рода. Возможно, следует выделить и несколько дополнительных видов, которые пока объединяют в кластер U, состоящий из симбионтов различных бобовых Новой Зеландии, Сенегала и Бразилии (De Lajudie et al., 1994) и иногда обозначаемых как отдельные геномные виды симбионтов *Cicer arietinum* (Nour et al., 1995) и *L. corniculatus* (Sullivan et al., 1996).

V.A.13. Mesorhizobium loti (Jarvis et al., 1982)

Этот дополнительный вид азотфиксирующих симбионтов бобовых был выделен первым после публикации списка подтвержденных бактериальных видов (Skerman et al., 1980). Jordan (1984) отметил, что многие фенотипические и биохимические свойства штаммов, нодулирующих *Lotus*, характерны и для других быстрорастущих ризобий. Отличительными свойствами является расположение симбиотических генов на хромосоме и полярное (субполярное) жгутикование. Типовой штамм нодулирует большинство видов *Lotus*, однако симбиоз в некоторых случаях является неэффективным в отношении азотфиксации. Более того, симбиотическая эффективность у видов *Lotus* варьирует в зависимости от того, какой быстрорастущий штамм использован для инокуляции (Pankhurst, Jones, 1979). Типовой штамм NZP2213 отличается от штаммов других родов на основании результатов ДНК-гибридизации и анализа последовательностей рРНК малой субъединицы рибосомы (Jarvis et al., 1982; Willems, Collins, 1993).

Еще до использования молекулярных методов были выявлены 2 резко различающиеся группы ризобий, нодулирующих *Lotus*. Они различаются по ультраструктуре бактериоидов (Craig et al., 1973), внутренним антигенам (Vincent, Humphrey, 1970; Pankhurst, 1979), составу внеклеточных полисахаридов (Bailey et al., 1971), электрофоретическим свойствам растворимых

белков (Roberts et al., 1980), скорости роста и продукции кислот на среде с дрожжевым экстрактом (Norris, 1965; Abdel-Ghaffar, Jensen 1966; Brockwell et al., 1966), чувствительности к антибиотикам (Pankhurst, 1977), отношению к фагам (Patel, 1976) и способности к симбиозу с различными растениями (Erdman, Means, 1949; Abdel-Ghaffar, Jensen 1966; Jensen 1967; Jensen, Hansen, 1968; Pankhurst, 1977; Crow et al., 1981). Дивергенция быстро- и медленно растущих ризобий, нодулирующих *Lotus*, подтверждается данными о гомологии ДНК, на основании которых симбионты *Lotus* классифицированы в две группы (4 и 6), между которыми эта гомология составляет менее 10% (Crow et al., 1981). Рибосомные РНК медленно растущих симбионтов *Lotus* ближе к таковым для *Bradyrhizobium*, чем для *Rhizobium* (Jarvis et al., 1986). Данные о последовательностях рРНК малой субъединицы рибосомы для медленно растущих ризобий *Lotus* пока отсутствуют.

В дополнение к очевидным различиям быстро- и медленно растущих ризобий *Lotus*, существенная дивергенция выявлена и среди быстрорастущих штаммов. Показана вариабельность гомологии ДНК для штаммов 4 групп, выделенных из разных видов *Lotus* (Crow et al., 1981). Штамм СС811 из *L. corniculatus* и штамм СС809а из *L. maroccanus* имели величину относительной гибридизации 49%. Между штаммами NZP2213 и NZP2037 выявлены существенные различия по эффективности азотфиксации в симбиозе с 9 видами *Lotus* (Pankhurst, Jones, 1979). Эти 2 штамма различаются также по гомологии ДНК (De Lajudie et al., 1994). Гомология ДНК штамма NZP2213 по сравнению с другими симбионтами *Lotus* (R88B, R8CS) и с несимбиотическими штаммами ризобий, выделенными из почв Новой Зеландии, на которых произрастает *L. corniculatus*, составляет менее 60%. Штамм ICMP3153, используемый для инокуляции *L. corniculatus* в Новой Зеландии, был изначально выделен в Ирландии (J. Sullivan, личное сообщение) и его генотип ближе к *R. huakuii*, чем к другим штаммам, выделенным из *Lotus* (Sullivan et al., 1996). Данные о генетическом варьировании ризобий *Lotus* показывают, что растения этого рода вступают в симбиоз с широким спектром видов, относящихся по меньшей мере к 2 родам ризобий.

V.A.14. Mesorhizobium huakuii (Chen et al., 1991)

Этот вид бактерий объединяет симбионтов бобовых рода *Astragalus*, который насчитывает 1500-2000 видов (Allen, Allen, 1980). Одни виды астрагала используют для получения растительного клея, а другие — как индикаторы присутствия селена и урана, тогда как некоторые астрагалы образуют вещества, токсичные для сельскохозяйственных животных. В Азии *A. sinicus* используется как зеленое удобрение и кормовая культура.

Анализ 9 изолятов ризобий, выделенных в Китае (Hubei, Nanjing) из *A. sinicus*, показал, что они относятся к особой группе гомологии ДНК (Chen et al., 1991). В описании *M. huakuii* штамм NZP2213 используется как стандарт, для которого величины гомологии ДНК с другими видами ризобий составляют 25-35%. Типовой штамм *M. huakuii* ССBAU2609 принадлежит к тому же роду, что и *M. loti*, о чем говорит сходство последовательностей рРНК малой субъединицы рибосомы (Sawada et al., 1993; Willems, Collins, 1993). Однако по некоторым данным (Chen et al., 1991) *M. huakuii* отличается от других типовых штаммов этого рода локализацией симбиотических генов на плазмидах. Штаммы ризобий, выделенные из *A. sinicus* в Японии, также идентифицированы как *M. huakuii* на основании фенотипических характеристик (Murooka et al., 1993). Отличительным свойством японских штаммов является то, что они, в отличие от типового штамма, нодулируют *A. sinicus* сорт Japan. На основании этих результатов было предложено выделить японские изоляты в особый биотип, *M. huakuii* biovar *rengae*. Однако, молекулярные данные, подтверждающие такое выделение, пока отсутствуют.

V.A.15. Mesorhizobium ciceri (Nour et al., 1994b) и M. mediterraneum (Nour et al., 1995) - виды, нодулирующие нут

После выделения видов *M. loti* и *M. huakuii* было показано, что отдельные виды ризобий нодулируют нут — *Cicer arietinum*. Один из них был классифицирован как *M. ciceri* (Nour et al., 1994b, 1995). Типовой штамм этого вида, UPM-Са7 имеет 44% и 19% гомологии ДНК с типовыми

ми штаммами *M. loti* и *M. huakuii*, соответственно (Nour et al., 1994b). Последовательности рРНК малой субъединицы рибосомы гомологичны таковым для *M. loti* и *M. huakuii* на 99.8% и 98.2%, соответственно.

Другой вид ризобий нодулирующих нут, классифицирован как *M. mediterraneum* (Nour et al., 1995). Его типовой штамм UPM-Са36 имеет 31%, 29% и 42% гомологии ДНК с типовыми штаммами *M. loti*, *M. huakuii* и *M. ciceri*, соответственно (Nour et al., 1994b, 1995). Сходство последовательностей рРНК малой субъединицы рибосомы составляет 98.5%, 99.2%, 98.6% (Nour et al., 1995). К сожалению, при классификации вида *M. mediterraneum* не были использованы данные о гомологии ДНК двух типовых штаммов и штаммов, использованных Crow et al. (1981) для идентификации группы 4. Такие данные могли бы пролить дополнительный свет на генетические взаимоотношения ризобий, нодулирующих *Lotus* и *Cicer*, поскольку некоторые штаммы, изученные Crow et al. (1981), проявляли 88% гомологии ДНК с одним из стандартных штаммов, выделенных из *Lotus*.

V.A.16. *Mesorhizobium tianshanense* (Chen et al., 1995)

Этот вид объединяет штаммы, выделенные из 7 видов бобовых, произрастающих в Китае, провинция Xinjiang (Chen et al., 1995). 17 изолятов составили группу, показавшую сходство при анализе 148 фенотипических характеристик. Штамм ССВАУ3306 (А-1BS) был выбран в качестве типового для вида *M. tianshanense*. Величины гомологии ДНК для типового штамма и других изолятов, классифицированных как *M. tianshanense*, составили 75-100%. Гомология ДНК этого штамма и других изученных типовых штаммов была низкой, за исключением штамма *M. huakuii* (64%). Полная последовательность рРНК малой субъединицы рибосомы для *M. tianshanense* пока не установлена. Однако, частичная последовательность (260 пар оснований) штамма ССВАУ3306 идентична таковой для типового штамма *M. ciceri* (Chen et al., 1991). Позднее было показано, что гомология ДНК для типовых штаммов *M. tianshanense* и *M. huakuii* составляет лишь 13.9%, а сходство последовательностей рРНК малой субъединицы рибосомы для ССВАУ3306 и типовых штаммов *M. loti* и *M. huakuii* составляет 97.4% и 97.9%, соответственно (Tan et al., 1997). Однако имеется 6 нуклеотидных различий в пределах участка в 260 пар нуклеотидов полноразмерной последовательности, соответствующей ранее опубликованной частичной последовательности рРНК малой субъединицы рибосомы. Показано более близкое сходство *M. tianshanense* с другими видами этого рода, основанное на независимом определении полных последовательностей рРНК малой субъединицы рибосомы у штамма ССВАУ3306 (Jarvis et al., 1997).

V.A.17. *Phyllobacterium* (Knösel, 1962)

Phyllobacterium остается наименее изученным родом Rhizobiaceae. В дополнение к выявлению на поверхности и в разрастаниях листьев некоторых тропических растений, филлобактерии были выделены из корней сахарного тростника (Lambert et al., 1990). Эти штаммы идентифицированы как *Phyllobacterium* путем фенотипической характеристики и электрофоретического анализа белков. Нуклеотидные последовательности рРНК малой субъединицы рибосомы у двух типовых видов очень сходны (Yanagi, Yamasoto, 1993), однако данные по реассоциации ДНК отсутствуют, что затрудняет идентификацию видов. По сравнению с родом *Mesorhizobium*, эти последовательности гомологичны на 97.0% (табл. 1), что говорит о филогенетической близости двух родов. Возможно, что использование подходов молекулярной эволюционной систематики позволит рекласифицировать *Phyllobacterium*, как это было сделано для *R. galegae*. В частности, еще предстоит доказать, что *Phyllobacterium* является родом, отдельным от *Mesorhizobium* (подобно тому как необходимо доказать независимость *R. galegae* от *Agrobacterium*).

V.A.18. *Rhizobium* (Frank, 1889)

В настоящее время в роде *Rhizobium* выделяют 4 вида. Кроме того, имеются предложения о выделении 3 дополнительных видов — *R. gallicum*, *R. hainanense* и *R. mongolense*. Типовой штамм *R. leguminosarum* (USDA2370, ATCC10004) является также и типовым штаммом рода *Rhizobium*. Другими признанными видами являются *R. etli* (типовой штамм CFN42) и *R. tropici* (типовой

штамм CIAT899). Нуклеотидные последовательности рРНК малой субъединицы рибосомы у трех типовых штаммов очень сходны: они варьируют от 97.8% до 99.0% (Willems, Collins, 1993; van Berkum et al., 1996). Имеются данные о том, что эти гены у *R. etli* и *R. leguminosarum* могут претерпевать рекомбинацию (Eardly et al., 1995, 1996). Анализ реассоциации ДНК-ДНК свидетельствует о разделении *Rhizobium* на три вида (Martinez-Romero et al., 1991; van Berkum et al., 1996).

V.A.19. Rhizobium leguminosarum (Frank, 1889)

Изначально это название использовали для симбионтов *Vicia*, подчеркивая их отличие от симбионтов *Trifolium* (*R. trifolii*) и *Phaseolus* (*R. phaseoli*). Однако большинство симбионтов растений двух последних родов реклассифицировано как *R. leguminosarum* на основании подробной фенотипической и генетической характеристики (Jordan, 1984). Прежним видам были присвоены внутривидовые ранги (биотипы), позволяющие разделить их на основании специфичности по отношению к растениям, которая кодируется плазмидами. Этими внутривидовыми рангами являются биотип *viciae* для симбионтов бобовых трибы *Vicieae*, биотип *trifolii* для симбионтов *Trifolium* и биотип *phaseoli* для симбионтов *Phaseolus*.

V.A.20. Rhizobium tropici (Martinez-Romero et al., 1991)

В соответствии с пересмотренной классификацией *R. phaseoli*, штаммы ризобий фасоли стали называть *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Jordan, 1984). Однако, еще до этой реклассификации имелись данные о генетической гетерогенности симбионтов фасоли (Jarvis et al., 1980; Crow et al., 1981). Ризобии, полученные из клубеньков фасоли в Мексике, Южной и Центральной Америке, представляют собой гетерогенный комплекс, состоящий из филогенетически разнородных линий, что говорит о возможности выделения нескольких видов (Pinero et al., 1988). Одна из линий была впоследствии классифицирована как *R. tropici* (Martinez-Romero et al., 1991), однако и в этом виде выявлены две подгруппы, А и В. Возможно, эти подгруппы заслуживают выделения в разные виды. Типовым штаммом *R. tropici* является CIAT899, представляющий подгруппу В. На основании данных о последовательностях рРНК малой субъединицы рибосомы показано, что филогенетическое положение *R. tropici* и *R. leguminosarum* различно. Ризобии фасоли, не входящие в *R. tropici*, предварительно классифицируют как *R. leguminosarum*.

V.A.21. Rhizobium etli (Segovia et al., 1993)

Особенности последовательностей рРНК малой субъединицы рибосомы впервые выяснились при их частичном анализе у штаммов, нодулирующих люцерну и фасоль (Eardly et al., 1992). На этом основании данные группы изолятов были обозначены как *Rhizobium* sp. типа I, а не *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (Eardly et al., 1992). Позднее было показано, что эта группа своеобразна генетически и фенотипически (Segovia et al., 1993), что позволило предложить для нее название *R. etli*. Анализ полной последовательности рРНК малой субъединицы рибосомы и реассоциации ДНК-ДНК подтвердил правомерность видового статуса *R. etli* (van Berkum et al., 1996).

V.A.22. Rhizobium galegae (Lindström, 1989)

Ранее ризобии, вступающие в симбиоз с козлятником восточным (*Galega orientalis*) и козлятником лекарственным (*G. officinalis*), классифицировали как *R. leguminosarum* или же находили таксономическое родство с ризобиями, впоследствии включенными в род *Mesorhizobium* (Hauke-Pasiewiczowa, 1952; Proctor, 1963). Однако оказалось, что по фенотипическим и биохимическим признакам эти ризобии сильно отличаются от представителей упомянутых родов (Lindstrom et al., 1983; Lindstrom, Lehtomaki, 1988; Lipsanen, Lindstrom, 1989). Кроме того, анализ реассоциации ДНК и последовательностей рРНК малой субъединицы рибосомы подтвердил необходимость выделения вида *R. galegae* (Lindstrom et al., 1983; Jarvis et al., 1986; Wedlock, Jarvis, 1986; Willems,

Collins, 1993). Филогенетическая позиция типового штамма HAMBI540 оказалась далекой от других симбионтов бобовых. Современные филогенетические построения позволяют сблизить *R. galegae* с *Agrobacterium vitis* (Sawada et al., 1993).

V.A.23. Rhizobium gallicum и R. giardinii, два дополнительных вида, выделенных из клубеньков Phaseolus vulgaris (Amarger et al., 1997)

Среди коллекции изолятов фасоли, собранных в различных регионах Франции, с использованием ДНК-проб и RFLP-анализа были выделены две группы, отличающиеся от *R. leguminosarum*, *R. etli* и *R. tropici* (Geniaux et al., 1993; Laguerre et al., 1993b). Впоследствии эти группы были признаны геномными видами, что подтвердилось данными по реассоциации ДНК и определению частичных последовательностей рРНК малой субъединицы рибосомы (Laguerre et al., 1993a). Типовыми штаммами являются: R602sp для *R. gallicum* и H152 и для *R. giardinii*. Разделение этих видов было подтверждено данными о последовательностях рРНК малой субъединицы рибосомы (Amarger et al., 1997). Однако, филогенетически *R. giardinii* весьма сильно удален от других представителей *Rhizobium*, так как гомология последовательностей рРНК составляет лишь 95.5–96.2%. Несмотря на относительную близость *R. giardinii* с *R. galegae* и *Agrobacterium*, последовательности рРНК не позволяют классифицировать *R. giardinii* в эти два рода (Amarger et al., 1997).

V.A.24. Rhizobium hainanense (Chen et al., 1997)

Этот вид выделен на основании фенотипического анализа 63 штаммов ризобий, полученных из клубеньков 21 рода бобовых в провинции Hainan, находящейся в тропической части Китая (Goa et al., 1994). Среди них была выделена группа из 5 изолятов *Desmodium* и *Centrosema*. Типовой штамм этой группы CCBAU57015 (166) помещен в род *Rhizobium* на основании анализа последовательностей рРНК малой субъединицы рибосомы (Chen et al., 1997). Их выделение в качестве вида (*R. hainanense*) подтверждено низкими величинами гомологии ДНК с типовыми штаммами *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. tropici* и *A. rhizogenes*.

V.A.25. Rhizobium mongolense (van Berkum et al., 1997)

Вид включает симбионтов *Medicago ruthenica* — бобового, произрастающего во Внутренней Монголии. Оно является потенциально ценной кормовой культурой и может быть донором генов при селекции культурной люцерны (*M. sativa*) на устойчивость к стрессам. Однако, симбионты *M. ruthenica* принадлежат к роду *Rhizobium*, а не *Sinorhizobium*, как это характерно для *Medicago* (van Berkum et al., 1997). Типовой штамм *R. mongolense*, USDA1844 сильно отличается от *Sinorhizobium* по гомологии ДНК, последовательностям рРНК малой субъединицы рибосомы и по изоферментным характеристикам. Внутри этого вида удалось классифицировать штамм с химерным генотипом, что отражает общие проблемы систематики ризобий (van Berkum et al., 1997).

V.A.26. “Rhizobium lupini” (Schroetted, 1886; Eckhardt et al., 1931)

Пока имеются лишь очень ограниченные молекулярные данные, позволяющие судить о филогении ризобий, вступающих в симбиоз с люпинами. Штамм USDA3051 (USDA, штамм 3C2e1, депонированный в Американской коллекции типовых культур как ATCC10319) считается типовым штаммом этого “вида”. Анализ последовательностей рРНК малой субъединицы рибосомы позволил поместить этот штамм в род *Bradyrhizobium* (Ludwig et al., 1995). Первоначально “*R. lupini*” был классифицирован как *B. japonicum*, поскольку гомология ДНК типовых штаммов составила 99% (Hollis et al., 1981). Однако впоследствии оказалось, что типовая культура, полученная из Американской коллекции в качестве ATCC10319, загрязнена штаммом *B. japonicum*. В дальнейшем было показано, что гомология ДНК между ATCC10319 и типовым штаммом *B. japonicum* составляет 35% (Scholla et al., 1990), что подтвердили и мы, используя штамм USDA3051. Для 3 изолятов люпина, полученных из Мексики, гомология с типовым штаммом *B. japonicum*

составила не более 37% (Barrera et al., 1997). Хотя азотфиксирующие симбионты люпина могут оказаться отдельным видом *Bradyrhizobium*, сохраняется возможность их включения в род *Mesorhizobium*, поскольку штамм "L.densif85", выделенный из *Lupinus densiflorus*, по гомологии ДНК оказался близок к группе 4, состоящей из штаммов *Lotus* CC809a и CC811 (Crow et al., 1981).

V.A.27. *Sinorhizobium* (De Lajudie et al., 1994)

Существование дискретных генетических групп *Rhizobium* было показано путем широкого анализа реассоциации ДНК-ДНК, позволившего выявить однородную группу (группа 3), состоящую из симбионтов *Medicago* и *Trigonella* spp. (Crow et al., 1981). Предложенный стандартный штамм SU47 (Crow et al., 1981) был использован для идентификации представителей группы 3 и быстрорастущих ризобий сои, выделенных в Китае, для которых гомология ДНК составила 36–44% (Wedlock, Jarvis, 1986). Гомология ДНК этого штамма с *R. leguminosarum* и *R. galegae* составила 14% и 21%, соответственно. На основании данных нумерической таксономии было высказано предположение о том, что быстрорастущие изоляты сои, выделенные в Китае, составляют особый род *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988). Это предположение подтверждалось резкими фенотипическими отличиями быстрорастущих ризобий сои от других родов и видов Rhizobiaceae. Однако, выявленное сходство штаммов группы 3 и быстрорастущих ризобий сои по организации цистронов рРНК (Jarvis et al., 1986) и последовательностям рРНК малой субъединицы рибосомы (Jarvis et al., 1992; Willems, Collins, 1993) вошло в противоречие с изученными ранее фенотипическими отношениями (Chen et al., 1988). Поэтому данные молекулярной эволюционной систематики не подтвердили выделение быстрорастущих ризобий сои в отдельный род. Позднее родовое название *Sinorhizobium* было использовано, в соответствии с правилами приоритета номенклатуры, для придания особого родового статуса бактериям, принадлежащим к группе 3 быстрорастущих ризобий сои, а также двум новым видам, выделенным из тропических деревьев в Сенегале (De Lajudie et al., 1994). В настоящее время род *Sinorhizobium* состоит из 4 признанных видов: *S. meliloti* (ранее *R. meliloti* или штаммы группы 3), *S. fredii* (быстрорастущие ризобии сои, выделенные в Китае), *S. saheli* и *S. terangaе*, а также недавно предложенного вида *S. medicae*, вступающего в симбиоз с многолетней и некоторыми однолетними видами люцерны.

V.A.28. *Sinorhizobium meliloti* (Dangeard, 1926)

Rhizobium meliloti как признанный вид был включен в список подтвержденных названий бактерий (Skerman et al., 1980). Этот вид был отделен от других видов *Rhizobium* на основании фенотипических характеристик и специфичности по отношению к растениям (Jordan, 1984). Особый видовой статус в пределах *Sinorhizobium* подтвержден гибридизацией ДНК-ДНК и анализом нуклеотидных последовательностей рРНК малой субъединицы рибосомы. На основании результатов MLEE-анализа в этом виде выделены две подгруппы, А и В (Eardly et al., 1990). Предположение о том, что эти подгруппы представляют собой отдельные виды, входит в противоречие с энзиматическими характеристиками штамма CC2013, который является рекомбинантом между этими подгруппами (Eardly et al., 1990). Типовой штамм вида (USDA1002, ATCC9930) представляет подгруппу А.

V.A.29. *Sinorhizobium medicae* (Rome et al., 1996b)

73 штамма, выделенные в 2 регионах Франции из клубеньков *Medicago truncatula*, были разделены на 2 подгруппы на основании данных PCR-RFLP анализа и реассоциации ДНК-ДНК (Rome et al., 1996a). Одна из них идентифицирована как подгруппа В *S. meliloti*, штаммы М3 и М104. Впоследствии выяснилось, что 11 изолятов, представляющие обе подгруппы, могут быть объединены на основании 9 фенотипических свойств и способности формировать азотфиксирующие клубеньки на *M. polymorpha*. Сходство последовательностей рРНК малой субъединицы рибо-

сомы для типового штамма *S. medicae* A321 и типового штамма *S. meliloti* составило 99.7% (Rome et al., 1996b), а гомология ДНК — 60% (Rome et al., 1996a).

V.A.30. Sinorhizobium fredii (Scholla, Elkan, 1984)

Вид объединяет быстрорастущие штаммы ризобий, которые неоднократно выделяли из клубеньков сои в Китае (Keyser et al., 1982; Dowdle, Bohlool, 1985; Lin et al., 1987; Chen et al., 1988). Вид (типовой штамм USDA205, ATCC35243) отличается от других симбионтов бобовых по гомологии ДНК, специфичности по отношению к растениям, скорости роста, устойчивости к антибиотикам и серологическим свойствам. Анализ последовательностей рРНК малой субъединицы рибосомы и реассоциации ДНК показал сходство *S. fredii* и *S. meliloti* (Wedlock, Jarvis, 1986; Jarvis et al., 1992; Willems, Collin, 1993). Быстрорастущий тропический штамм NGR234 (выделен из клубеньков *Lablab purpureus*) близок к *S. fredii* по серологическим свойствам, структуре генов *nodD* и рРНК малой субъединицы рибосомы, а также по данным FАME-анализа (Jarvis et al., 1992; Jarvis, Tighe, 1994). 11 изученных штаммов *R. fredii* разделены на 2 подгруппы: *S. fredii* хемотип *fredii* и *S. fredii* хемотип *sinensis* (Scholla, Elkan, 1984; Wedlock, Jarvis, 1986).

V.A.31. Sinorhizobium saheli (De Lajudie et al., 1994)

Вид включает симбионтов растений *Sesbania*, растущих в области Sahel Африки, которые нодулируют также *Acacia seyal*, *Leucaena leucocephala* и *Neptunia oleracea*. Типовой штамм ORS609 может быть дифференцирован от других видов *Sinorhizobium* и родов ризобий на основании данных о реассоциации ДНК, гибридизации ДНК-РНК, электрофоретическом составе белков (SDS-PAGE) и последовательностях рРНК малой субъединицы рибосомы.

V.A.32. Sinorhizobium terangae (De Lajudie et al., 1994)

Вид включает симбионтов различных видов *Sesbania* и *Acacia*, растущих в Сенегале, западная Африка. По спектру хозяев эти бактерии сходны с *S. saheli*. Типовой штамм ORS1009 может быть дифференцирован от других видов *Sinorhizobium* и родов ризобий на основании данных о реассоциации ДНК, гибридизации ДНК-РНК, электрофоретического состава белков (SDS-PAGE) и последовательностях рРНК малой субъединицы рибосомы.

VI. Возможные альтернативные критерии вида

Виды Rhizobiaceae, проанализированные в нашей статье, могут быть разделены путем полифазного анализа, включающего характеристику колоний и культур, гибридизацию ДНК-ДНК, анализ последовательностей рРНК в качестве стандартных критериев (Graham et al., 1991). Однако некоторые специалисты в области популяционной генетики бактерий считают, что эти методы не всегда могут обеспечить точную оценку эволюционных отношений. Например, Майнард Смит (Maynard Smith, 1995) считает гибридизацию ДНК мало информативной для определения статуса бактериальных видов, так как этот метод дает произвольное деление бактериального континуума. Это мнение представляется справедливым в связи с тем, что частота генетического обмена между бактериями изменяется более или менее непрерывно в зависимости от генетического расстояния (Roberts, Cohan, 1993).

Проблема интенсивности генетического обмена у бактерий особенно актуальна в связи с использованием генов рРНК для разграничения близких видов, у которых эти гены различаются лишь по нескольким нуклеотидным позициям (Fox et al., 1992). Очевидно, что эволюционные факторы, такие как рекомбинация и естественный отбор, необходимо рассматривать критически, когда данные о полиморфизме рРНК используются для построения филогенетических организмов. Как и другие бактерии, ризобии имеют множественные опероны рРНК (Honeycutt et al., 1993; Kundig et al., 1995), которые могут облегчать рекомбинацию между дивергировавшими аллелями (Hill et al., 1977; Anderson, Roth, 1981; Peters, Hill, 1988). Обычно предполагает-

ся наличие сильного негативного отбора против рекомбинантов по генам рРНК, связанное со снижением эффективности трансляции (Hill et al., 1977; Niebel et al., 1987; Peters, Hill, 1988). Однако показано, что эти гены могут быть подвержены рекомбинации у *Aeromonas* (Sneath, 1993), *Rhizobium* (Eardly et al., 1995, 1996; Sullivan et al., 1996), *Escherichia* (Cilia, 1996). При изучении полиморфизма по локусам *rrn* у одного из штаммов *E. coli* выяснилось, что прямое секвенирование рРНК малой субъединицы рибосомы (с использованием PCR) позволяет выявить только среднюю величину имеющейся гетерогенности (Cilia et al., 1996). При этом оказалось также, что предшествовавшая генная конверсия может влиять на наблюдаемую изменчивость. Против предположения о сильной негативной селекции рекомбинантов по генам рРНК говорят и данные о том, что гетерогенность оперонов *rrn* у *Escherichia coli* в определенных условиях может давать бактериям адаптивные преимущества (Cordon et al., 1995). Более того, некоторые полиморфные нуклеотидные позиции в рРНК малой и большой субъединиц рибосомы могут подвергаться селективному действию средовых факторов, например, антибиотиков (Cundliffe, 1990; Aagard et al., 1994; Fourmy et al., 1996). Последовательности рРНК скорее всего останутся важным инструментом для определения филогенетических расстояний у бактерий, однако их использование может давать неточные результаты при определении статуса таксонов на внутривидовом уровне.

Предполагается (Dykhuizen, Green, 1991), что наилучшим подходом для определения границ вида у бактерий может служить использование концепции биологического вида, которая определяет вид как группу штаммов, имеющих общий генетический пул (благодаря горизонтальному переносу генов и рекомбинации). Путем анализа MLEE-профилей было показано, что хромосомные аллели могут рекомбинировать с низкими, но детектируемыми частотами в популяциях *Rhizobium* (Eardly et al., 1990; Maynard Smith et al., 1993; Souza et al., 1994; Demezas et al., 1995; Gordon et al., 1995; Sullivan et al., 1995, 1996) и *Bradyrhizobium* (Bottomley et al., 1994). Практически это может быть показано путем сравнения последовательностей множественных локусов в группах штаммов, которые считают принадлежащими к одному виду. Если окажется, что филогенетические отношения внутри группы одинаковы для каждого изученного локуса (филогении различных генов конгруэнтны в пределах группы штаммов), это будет свидетельствует о том, что гены (а значит и несущие их штаммы) в прошлом были генетически изолированы и могут считаться биологическим видами. Напротив, если горизонтальный перенос генов и рекомбинация в пределах группы происходят часто, то филогении генов будут "перекрещиваться" в зависимости от рекомбинационной истории разных локусов. В этом случае мультилокусный анализ последовательностей показывает, что представители группы принадлежат к одному виду.

Возможно, более универсальным критерием биологического вида у бактерий является возможность перманентной нейтральной дивергенции последовательностей (Cohan, 1994). Практическими неудобствами этого подхода является то, что весьма разнородные единицы могут быть признаны видами в различных таксонах (в связи с различными уровнями рекомбинации), а также то, что для его реализации необходимо получение большого количества данных по секвенированию (Maynard Smith, 1995). Однако быстрое развитие методов секвенирования может облегчить выделение видов, повышая возможность идентификации общего генетического пула внутри популяции, а также обеспечивая получение данных о мозаицизме на геномном уровне.

VII. Литература

- Aangard C., Phan H., Trevisanato S., Garrett R.A. (1994) J. Bacteriol. V. 176, p. 7744-7747.
- Abdel-Ghaffar A.S., Jensen H.L. (1966) Arch. Microbiol. V. 54, p. 393-405.
- Allen O.N., Allen E.K. (1980) The Leguminosae, a source book of characteristics, uses, and nodulation. The University of Wisconsin Press, Madison, WI.
- Amarger N., Macheret V., Laguerre G. (1997) Int. J. Syst. Bacteriol. V. 47, p. 996-1006.
- Anderson P., Roth J.R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 78, p. 3113-3117.
- Bailey R.W., Greenwood R.M., Craig A. (1971) J. Gen. Microbiol. V. 65, p. 315-324.
- Barrera L.L., Trujillo M.E., Goodfellow M., Garcia F.J., Hernandez-Lucas I., Davila G., van Berkum P., Martinez-Romero E. (1997) Int. J. Syst. Bacteriol. V. 47, p. 1086-1091.
- Beijerinck M.W., van Delden A. (1902) Centbl. Bakteriologie. (etc.) Pt. II. V. 9, p. 3-43.
- Bottomley P.J., Cheng H., Strain S.R. (1994) Appl. Environ. Microbiol. V. 60, p. 1754-1761.
- Bouzar H. (1994) Int. J. Syst. Bacteriol. V. 44, p. 373-374.
- Bouzar H., Chilton W.S., Nesme X., Dessaux Y., Vaudequin V., Petit A., Jones J.B., Hodge N.C. (1994) Appl. Environ. Microbiol. V. 61, p. 65-73.
- Brockwell J., Asuo S.E., Rea G.A. (1966) J. Aust. Inst. Agric. Sci. V. 32, p. 295-297.
- Burgin A.B., Parodos K., Lane D.J., Pace N.R. (1990) Cell. V. 60, p. 405-414.
- Burton J.C. (1979). *Rhizobium* species. In: H.J. Peppier, D. Perlman (eds.). Microbial Technology 2nd ed. V. 1, Microbial Processes, Academic Press Inc., NY.
- Cadahia E., Leyva A., Ruiz-Argueso T. (1986) Arch. Microbiol. V. 146, p. 239-244.
- Chen W.X., Li G.S., Qi Y.L., Wang E.T., Yuan H.L., Li J.L. (1991) Int. J. Syst. Bacteriol. V. 41, p. 275-280.
- Chen W.X., Tan Z., Gao J., Wang E. (1997) Int. J. Syst. Bacteriol. V. 47, p. 870-873.
- Chen W.X., Wang E.T., Wang S., Li Y., Chen X., Li Y. (1995) Int. J. Syst. Bacteriol. V. 45, p. 153-159.
- Chen W.X., Yan G.H., Li J.L. (1988) Int. J. Syst. Bacteriol. V. 38, p. 392-397.
- Chua K.-Y., Pankhurst C.E., MacDonald P.E., Hopcroft D.H., Jarvis B.D.W., Scott B.D. (1985) J. Bacteriol. V. 162, p. 335-343.
- Cilia V., Lafay B., Christen R. (1996) Mol. Biol. Evol. V. 13, p. 451-461.
- Cohan F.M. (1994) Trends Ecol. Evol. V. 9, p. 175-180.
- Condon C., Liveris D., Squires C., Schwartz I., Squires C.L. (1995) J. Bacteriol. V. 177, p. 4152-4156.
- Conn H.J. (1938) J. Bacteriol. V. 36, p. 320-321.
- Conn H.J. (1942) J. Bacteriol. V. 44, p. 353-360.
- Craig A.S., Greenwood R.M., Williamson K.I. (1973) Arch. Microbiol. V. 89, p. 23-32.
- Crow V.L., Jarvis B.D.W., Greenwood R.M. (1981) Int. J. Syst. Bacteriol. V. 31, p. 152-172.
- Cundliffe E. (1990) In: W.E. Hill, Moore P.B., Dahlberg A., Schlessinger D., Garret R.A., Wamer J.R. (eds.). The ribosome structure, function, and evolution. American Society for Microbiology, Washington, D.C., p. 479-490.
- Dangeard P.A. (1926) Botaniste (Paris). V. 16, p. 1-275.
- Date R.A., Decker A.M. (1965) Can. J. Microbiol. V. 11, p. 1-8.
- De Bruijn F.J. (1992) Appl. Environ. Microbiol. V. 58, p. 2180-2187.
- De Faria S.M., Franco A.A., de Jesus R.M., de Menandro M., Baitello J.B., Mucci E.S.F., Dobereiner J., Sprent J.I. (1984) New Phytol. V. 98, p. 317-328.
- De Faria S.M., de Lima H.C., Franco A.A., Mucci E.S.F., Sprent J.I. (1987) Plant and Soil. V. 99, p. 347-356.
- De Faria S.M., Lewis G.P., Sprent J.I., Sutherland J.M. (1989) New Phytol. V. 111, p. 607-619.
- De Lajudie P., Willems A., Pot B., Dewettinck D., Maestrojuan G., Neyra M., Collins M.D., Dreyfus B., Kersters K., Gillis M. (1994) Int. J. Syst. Bacteriol. V. 44, p. 715-733.
- De Ley J., Tjijgat R., De Smedt J., Michiels M. (1973) J. Gen. Microbiol. V. 78, p. 241-252.
- Demezas D.H., Reardon T.B., Strain S.R., Watson J.M., Gibson A.H. (1995) Mol. Ecol. V. 4, p. 209-220.
- Demezas D.H., Reardon T.B., Watson J.M., Gibson A.H. (1991) Appl. Environ. Microbiol. V. 57, p. 3489-3495.
- Dooley J.J., Harrison S.P., Mytton L.J., Dye M., Cresswell A., Skot L. (1993) Can. J. Microbiol. V. 39, p. 665-673.
- Dowdle S.F., Bohloul B.B. (1985) Appl. Environ. Microbiol. V. 50, p. 1171-1176.
- Dreyfus B., Garcia J.L., Gillis M. (1988) Int. J. Syst. Bacteriol. V. 38, p. 89-98.
- Dykhuizen D.E., Green L. (1991) J. Bacteriol. V. 173, p. 7257-7268.
- Eardly B.D. (1994) In: R. W. Weaver, J. S. Angle, P. J. Bottomley (eds.). Methods of Soil Analysis. Part 2 - Microbiological and Biochemical Properties. Soil Science Society of America, Inc., Madison, WI, p. 557-573.
- Eardly B.D., Materon L.A., Smith N.H., Johnson D.A., Rumbaugh M.D., Selander R.K. (1990) Appl. Environ. Microbiol. V. 56, p. 187-194.
- Eardly B.D., Wang F.-S., van Berkum P. (1996) Plant and Soil. V. 186, p. 69-74.
- Eardly B.D., Wang F.-S., Whittam T.S., Selander R.K. (1995) Appl. Environ. Microbiol. V. 58, p. 1809-1815.
- Eardly B.D., Young J.P.W., Selander R.K. (1992) Appl. Environ. Microbiol. V. 58, p. 1809-1815.
- Eckhardt M.M., Baldwin I.R., Fred E.B. (1931) J. Bacteriol. V. 21, p. 273-285.
- Elkan G.H. (1992) Can. J. Microbiol. V. 38, p. 446-450.
- Engvild K.C., Jensen E.S., Skot L. (1990) Plant and Soil. V. 128, p. 283-286.
- Erdman L.W., Means U.M. (1949) Soil. Sci. Soc. Proc. V. 14, p. 170-175.

- Evguenieva-Hackenberg E., Selenska-Pobell S. (1995) *Lett. Appl. Microbiol.* V. 21, p. 402-405.
- Felsenstein J. (1993) PHYLIP (phylogenetic inference package). Version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Fourmy D., Recht M.I., Blanchard S.C., Puglisi J.D. (1996) *Science*. V. 274, p. 1367-1371.
- Fox G.E., Wisotzkey J.D., Jurtshuk Jr. P. (1992) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 42, p. 166-170.
- Frank B. (1889). *Ber. Deut. Bot. Ges.* V. 7, p. 332-346.
- Fred E.B., Baldwin I.L., McCoy E. (1932) *Root nodule bacteria and leguminous plants*. Univ. Wisconsin Studies in Sciences, N 5. Univ. Wisconsin Press, Madison.
- Geniaux E., Laguerre G., Amarger N. (1993) *Mol. Ecol.* V. 2, p. 295-302.
- Gillis M., De Ley J. (1980) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 30, p. 7-27.
- Gordon D.M., Wexler M., Reardon T.B., Murphy P.J. (1995) *Soil Biol. Biochem.* V. 27, p. 491-499.
- Graham P.H., Sadowsky M.J., Keyser H.H., Barnet Y.M., Bradley R.S., Cooper J.E., De Ley J., Jarvis B.D.W., Roslycky E.B., Strijdom W.B., Young J.P.W. (1991) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 41, p. 582-587.
- Graham P.H., Sadowsky M.J., Tighe S.W., Thompson J.A., Date R.A., Howieson J.G., Thomas R. (1995) *Can. J. Microbiol.* V. 41, p. 1038-1042.
- Grimont P.A.D. (1988) *Can. J. Microbiol.* V. 34, p. 541-546.
- Gunn C.R., Wiersema J.H., Ritchie C.A., Kirkbride J.H. (1992) US Department of Agriculture, Technical Bulletin No.1796.
- Harrison S.P., Jones D.G., Young J.P.W. (1989) *J. Gen. Microbiol.* V. 135, p. 1061-1069.
- Hauke-Paciewiczowa T. (1952) *Acta Microbiol. Pol.* V. 1, p. 37-39.
- Hildebrand E.M. (1940) *J. Agric. Sci.* V. 61, p. 685-698.
- Hill C.W., Grafstrom R.H., Harnish B.W., Hillman B.S. (1977) *J. Mol. Biol.* V. 116, p. 407-428.
- Hollis A.B., Kloos W.E., Elkan G.E. (1981) *J. Gen. Microbiol.* V. 123, p. 215-222.
- Holmes B. (1988) *Acta Hort.* V. 225, p. 47-52.
- Holmes B., Roberts P. (1980) *J. Appl. Bacteriol.* V. 50, p. 443-467.
- Honeycutt R.J., McClelland M., Sobral B.W.S. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 6945-6952.
- Hulton C.S., Higgins C.F., Sharp P.M. (1991) *Mol. Microbiol.* V. 5, p. 825-834.
- Jarvis B.D.W., Dick A.G., Greenwood R.M. (1980) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 30, p. 42-52.
- Jarvis B.D.W., Downer H.L., Young J.P.W. (1992) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 42, p. 93-96.
- Jarvis B.D.W., Gillis M., De Ley J. (1986) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 36, p. 129-138.
- Jarvis B.D.W., Pankhurst C.E., Patel J.J. (1982) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 32, p. 378-380.
- Jarvis B.D.W., van Berkum P., Chen W.X., Nour S.M., Fernandez M.P., Cleyet-Marel J.C., Gillis M. (1997) *J. Syst. Bacteriol.* V. 47, p. 895-898.
- Jensen H.L. (1967) *Arch. Mikrobiol.* V. 59, p. 174-179.
- Jensen H.L., Hansen A. (1968) *Acta Agric. Scan.* V. 18, p. 135-142.
- Jensen M.A., Straus N. (1993) *PCR Methods Appl.* V. 3, p. 186-194.
- Jensen M.A., Webster J.A., Straus N. (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 59, p. 945-952.
- Johnson L.I. (1984) In: Krieg N.R., Holt J.G. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. V. 1, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 8-11.
- Jordan D.C. (1982) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 32, p. 136-139.
- Jordan D.C. (1984) In: Krieg N.R., Holt J.G. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. V. 1, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 234-244.
- Judd A.K., Schneider M., Sadowsky M.J., de Bruijn F.J. (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 59, p. 1702-1708.
- Kerstens K., De Ley J. (1984) In: Krieg N.R., Holt J.G. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. V. 1, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 244-254.
- Kerstens K., De Ley J., Sneath P.A.H., Sackin M. (1973) *J. Gen. Microbiol.* V. 78, p. 227-239.
- Keyser H.H., Bohlool B.B., Hu T.S., Weber D.F. (1982) *Science*. V. 215, p. 1631-1632.
- King T.C., Sirdeskumukh R., Schlessinger D. (1986) *Microbiol. Rev.* V. 50, p. 428-451.
- Knosel D. (1962) *Zentralbl. Bakt. Parasit. Infekt. Hyg. II Abt.* 116, p. 79-100.
- Knosel D. (1984) In: Krieg N.R., Holt J.G. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. V. 1, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 254-256.
- Kordes E., Jock S., Fritsch J., Bosch F., Klug G. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 1121-1127.
- Kumar S., Tamura K., Nei M. (1993) MEGA, Mol. Evol. Genet. Anal. Vers. 1.01. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802.
- Kundig C., Beck C., Hennecke H., Gottfert M. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 5151-5154.
- Kuykendall L.D., Saxena B., Devine T.E., Udell S.E. (1992) *Can. J. Microbiol.* V. 38, p. 501-505.
- Laguerre G., Allard M.-R., Revoy F., Amarger N. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 60, p. 56-63.
- Laguerre G., Fernandez M.P., Edel V., Normand P., Amarger N. (1993a) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 43, p. 761-767.
- Laguerre G., Geniaux E., Mazurier S.I., Rodriguez-Casartelli R., Amarger N. (1993b) *Can. J. Microbiol.* V. 39, p. 412-419.
- Lambert B., Joos H., Dierickx S., Vantomme R., Swings J., Kersters K., van Montagu M. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 56, p. 1093-1102.
- Lessie T.G. (1965) *J. Gen. Microbiol.* V. 39, p. 311-320.
- Leung K., Strain S.R., de Bruijn F.J., Bottomley P.J. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 60, p. 416-426.
- Lin J., Walsh K.B., Johnson D.A., Canvin D.T., Shujin W., Layzell D.B. (1987) *Plant and Soil*. V. 99, p. 441-446.
- Lindstrom K. (1989) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 39, p. 365-367.

- Lindstrom K., Jarvis B.D.W., Lindstrom P.E., Patel J.J. (1983) *Can. J. Microbiol.* V. 29, p. 781-789.
- Lindstrom K., Lehtomaki S. (1988) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 50, p. 277-287.
- Lindstrom K., van Berkum P., Gillis M., Martinez E., Novikova N., Jarvis B. (1996) In: Tikhonovich I.A., Provorov N.A., Romanov V.I., Newton W.E. (eds.). *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht. p. 807-810.
- Lipsanen P., Lindstrom K. (1989) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 58, p. 323-328.
- Ludwig W., Rossello-Mora R., Aznar R., Klugbauer S., Springs S., Reetz K., Beimfohr C., Brockmann E., Kirchhof G., Dom S., Bachleitner M., Klugbauer N., Springers N., Lane D., Nietupsky R., Weizenegger M., Schleifer K.H. (1995) *Appl. Microbiol.* V. 18, p. 164-188.
- Mackay M.L., Zablén B., Woese C.R., Doolittle W.F. (1979) *Arch. Microbiol.* V. 123, p. 165-172.
- Maidak B.L., Larsen N., McCaughey M.J., Overbeek R., Olsen G.J., Fogel K., Blandy J., Woese C.R. (1994) *Nucl. Acids Res.* V. 22, p. 3485-3487.
- Marrs B., Kaplan S. (1970) *J. Mol. Biol.* V. 49, p. 297-317.
- Martin R., Humbert O., Camara M., Guenzi E., Walker J., Mitchell T., Andrew P., Prudhomme M., Alloing G., Hakenbeck R., Morrison D.A., Boulnois G.J., Claverys J.-P. (1992) *Nucl. Acids Res.* V. 20, p. 3479-3483.
- Martinez-de Drets G., Arias A. (1972) *J. Bacteriol.* V. 109, p. 467-470.
- Martinez-Romero E. (1994) *Plant and Soil.* V. 161, p. 11-20.
- Martinez-Romero E., Caballero-Mellado J. (1996) *Crit. Rev. Plant Sci.* V. 15, p. 113-140.
- Martinez-Romero E., Segovia L., Mercante F.M., Franco A.A., Graham P., Pardo M.A. (1991) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 41, p. 417-426.
- Maynard Smith J. (1995) In: Baumberg S., Young J.P.W., Wellington E.M.H., Saunders J.R. (eds.) *Population Genetics of Bacteria*, Cambridge University Press, Cambridge. P. 1-12.
- Maynard Smith J., Smith N.H., O'Rourke M., Spratt B.G. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 90, p. 4384-4388.
- Moffett M.L., Colwell R.R. (1968) *J. Gen. Microbiol.* V. 51, p. 245-266.
- Murooka Y., Xu Y., Sanada K., Araki M., Morinaga T., Yokota A. (1993) *J. Ferment. Bioeng.* V. 76, p. 38-44.
- Nei M., Li W.H. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 76, p. 5269-5273.
- Neibel H., Dorsch M., Stackebrandt E. (1987) *J. Gen. Microbiol.* V. 133, p. 2401-2409.
- Nick G., Lindstrom K. (1994) *Syst. Appl. Microbiol.* V. 17, p. 265-273.
- Norris D.O. (1965) *Plant and Soil.* V. 22, p. 143-166.
- Nour S.M., Cleyet-Marel J.-C., Beck D., Effosse A., Fernandez M.P. (1994a) *Can. J. Microbiol.* V. 40, p. 345-354.
- Nour S.M., Cleyet-Marel J.-C., Normand P., Fernandez M.P. (1995) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 45, p. 640-648.
- Nour S.M., Fernandez M.P., Normand P., Cleyet-Marel J.-C. (1994b) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 44, p. 511-522.
- Olsen G.J., Woese C.R., Overbeek R. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 1-6.
- Ophell K., Kerr A. (1990) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 40, p. 236-241.
- Oyaizu H., Sawada H. (1994) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 44, p. 374.
- Pankhurst C.E. (1977) *Can. J. Microbiol.* V. 23, p. 1026-1033.
- Pankhurst C.E. (1979) *Microbios.* V. 24, p. 19-28.
- Pankhurst C.E., Broughton W.J., Weineke U. (1983) *J. Gen. Microbiol.* V. 129, p. 2535-2543.
- Pankhurst C.E., Jones W.T. (1979) *J. Exp. Bot.* V. 30, p. 1095-1107.
- Pankhurst C.E., MacDonald P.E., Reeves J.M. (1986) *J. Gen. Microbiol.* V. 132, p. 2321-2328.
- Patel J.J. (1976) *Can. J. Microbiol.* V. 22, p. 204-212.
- Petes T.D., Hill C.W. (1988) *Annu. Rev. Genet.* V. 22, p. 147-168.
- Pinero D., Martinez E., Selander R.K. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 54, p. 2825-2832.
- Polhill R.M., Raven P.H., Stirton C.H. (1981) In: Polhill R.M., Raven P.H. (eds.). *Adv. Legume Syst.* Royal Botanic Gardens, Kew, England, p. 1-26.
- Ponsonnet C., Nesme X. (1994) *Arch. Microbiol.* V. 161, p. 300-309.
- Proctor M.H. (1963) *New Zel. J. Bot.* V. 1, p. 419-425.
- Rainey F.A., Wiegell J. (1996) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 46, p. 607-610.
- Rana D., Krishnan H.B. (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 134, p. 19-25.
- Riker A.J., Banfield W.M., Wright W.H., Keitt G.W., Sagen H.E. (1930) *J. Agr. Res.* V. 41, p. 507-540.
- Rinaudo G., Orena S., Fernandez M.P., Meugnier H., Bardin R. (1991) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 41, p. 114-120.
- Roberts G.P., Leps W.T., Silver L.E., Brill W.J. (1980) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 39, p. 414-422.
- Roberts M.S., Cohan F.M. (1993) *Genetics.* V. 134, p. 396-401.
- Rome S., Brunel B., Normand P., Fernandez M., Cleyet-Marel J.-C. (1996a) *Arch. Microbiol.* V. 165, p. 285-288.
- Rome S., Fernandez M., Brunel B., Normand P., Cleyet-Marel J.-C. (1996b) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 46, p. 972-980.
- Ruiz-Argueso T., Cadahia E., Leyva A. (1988) In: Beck D.P., Materon L.A. (eds.). *Nitrog. Fixat. Legum. Mediter. Agric.*, ICARDA, p. 109-119.
- Sawada H., Ieki H. (1992) *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* V. 58, p. 37-45.
- Sawada H., Ieki H., Oyaizu H., Matsumoto S. (1993) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 43, p. 694-702.
- Scholla M.H., Elkan G.H. (1984) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 34, p. 484-486.
- Scholla M.H., Moorefield J.A., Elkan G. (1990) *Syst. Appl. Microbiol.* V. 13, p. 288-294.
- Schroeter J. (1886) In: Conn F. (ed.) *Kryptogamenflora von Schlesien*, Band 3, Heft 3, Pilze J. U. Kern's Verlag, Breslau, p. 1-814.
- Schuch W., Loening U.E. (1975) *Biochem. J.* V. 149, p. 17-22.

- Segovia L., Pinero D., Palacios R., Martinez-Romero E. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 57, p. 426-433.
- Segovia L., Young J.P.W., Martinez-Romero E. (1993) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 43, p. 374-377.
- Selander R.K., Li J., Boyd E.F., Wang F.-S., Nelson K. (1994) In: Priest F.G., Ramos-Cormenzana A., Tindal B.J. (eds.). *Bact. Divers. System.* Plenum, NY, p. 17-49.
- Selenska-Pobell S., Evguenieva-Hackenberg E. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 6993-6998.
- Selenska-Pobell S., Gigova L., Petrova N. (1995) *J. Appl. Bacteriol.* V. 79, p. 425-431.
- Skerman V.B.D., McGowan V., Sneath P.H.A. (1980) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 30, p. 225-420.
- Smith E.F., Townsend C.O. (1907) *Science*. V. 25, p. 671-673.
- Sneath P.H.A. (1993) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 43, p. 626-629.
- Souza V., Guiarte L., Avila G., Cappello R., Gallardo C., Montoya J., Pinero D. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 60, p. 1260-1268.
- Souza V., Nguten T.T., Hudson R.R., Pinero D., Lenski R.E. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 89, p. 8389-8393.
- Stackebrandt E., Goebel R.M. (1994) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 44, p. 846-849.
- Stanley J., Brown G.G., Verma D.P. (1985) *J. Bacteriol.* V. 163, p. 148-154.
- Starr M.P., Weiss J.E. (1943) *Phytopathology*. V. 33, p. 314-318.
- Stern M.J., Ames G.F.-L., Smith N.H., Robinson E.C., Higgins C.F. (1984) *Cell*. V. 37, p. 1015-1026.
- Strain S.R., Leung K., Whittam T., de Bruijn F., Bottomley P.J. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 60, p. 2772-2778.
- Strain S.R., Whittam T.S., Bottomley P.J. (1995) *Mol. Ecol.* V. 4, p. 105-114.
- Sullivan J., Eardly B.D., van Berkum P., Ronson C.W. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 62, p. 2818-2825.
- Sullivan J., Patrick H.N., Lowther W.L., Scott D.B., Ronson C.W. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 92, p. 8985-8989.
- Tan Z., Xu X., Wang E., Gao J., Martinez-Romero E., Chen W. (1997) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 47, p. 874-879.
- Thompson J.A., Bhromsiri A., Shutsrirung A., Lillakan S. (1991) *Plant and Soil*. V. 135, p. 53-65.
- Van Berkum P., Beyene D., Eardly B.D. (1996) *Int. J. Bacteriol.* V. 46, p. 240-244.
- Van Berkum P., Beyene D., Bao G., Campbell A.T., Eardly B.D. (1997) *Int. J. Syst. Bacteriol.* (In press).
- Van Berkum P., Navarro R.B., Vargas A.A.T. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 60, p. 554-561.
- Van Berkum P., Tully R.E., Keister D.L. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 61, p. 623-629.
- Van Rossum D., Schuurmans F.P., Gillis M., Muyotcha A., van Verseveld H.W., Stouthamer A.H., Boogerd F.C. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 61, p. 1599-1609.
- Veraslovic J., Koeth T., Lupski J.R. (1991) *Nucleic Acids Res.* V. 24, p. 6823-6831.
- Veraslovic J., Schneider M., de Bruijn F.J., Lupski J.R. (1994) *Methods. Mol. Cell. Biol.* V. 5, p. 25-40.
- Wedlock D.N., Jarvis B.D.W. (1986) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 36, p. 550-558.
- Willems A., Collins M.D. (1993) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 43, p. 305-313.
- Wilson J.K. (1944) *Soil Sci.* V. 58, p. 61-69.
- Winkler M.E. (1979) *J. Bacteriol.* V. 139, p. 842-849.
- Wong F.Y.K., Stackebrandt E., Ladha J.K., Fleischman D.E., Date A., Fuerst J.A. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 60, p. 940-946.
- Xu L.M., Ge C., Cui Z., Li J., Fan H. (1995) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 45, p. 706-711.
- Yanagi M., Yamasoto K. (1993) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 107, p. 115-120.
- Young J.P.W. (1985) *J. Gen. Microbiol.* V. 131, p. 2399-2408.
- Young J.P.W. (1996) *Plant and Soil*. V. 186, p. 45-52.
- Young J.P.W., Demetriou L., Apte R.G. (1987) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 53, p. 397-402.
- Young J.P.W., Downer H.L., Eardly B.D. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 2271-2277.
- Young J.P.W., Haukka K.E. (1996) *New Phytol.* V. 133, p. 87-94.
- Young J.P.W., Wexler M. (1988) *J. Gen. Microbiol.* V. 134, p. 2731-2739.

Общая генетика

Хайнес М., Финан Т.

I. Введение: странное “семейство”	41
II. Генетические карты и организация генома	42
II.A. Структура генов	44
II.B. Плазмиды	45
II.C. Выделение плазмид	45
II.D. Конъюгация и группы несовместимости	46
II.E. Инструменты для манипулирования плазмидами	47
II.F. Фенотипы, определяемые плазмидами	48
III. Перенос генов и рекомбинация	50
III.A. Трансдукция	50
III.B. Трансформация	50
III.C. Конъюгация	51
III.D. Системы рестрикции и модификации	51
III.E. Генетическая рекомбинация	52
III.F. Инсерционные последовательности и транспозоны	52
IV. Векторы и другие генетические инструменты	53
IV.A. Векторы, реплицирующиеся в клетке-мишени	53
IV.B. Векторы-самоубийцы	55
IV.C. Транспозоны	56
IV.D. Проблемы будущего	56
V. Литература	57

I. Введение: странное “семейство”

В этой главе представлены общие знания о генетике бактерий семейства Rhizobiaceae. Поскольку эта группа не является семейством в филогенетическом смысле (глава I), достаточно трудно сделать обобщения, касающиеся ее генетики. Хотя филогения Rhizobiaceae активно развивается, традиционно границы семейства определяют, исходя из способности бактерий вызывать новообразования (опухоли или клубеньки) у растений (Jordan, 1982). Поскольку именно эти признаки бактерий привлекали наибольшее внимание, основная генетическая информация касается их способности к симбиотическим или патогенным взаимодействиям. Мы поставили целью обобщить базовые генетические знания о наиболее изученных представителях Rhizobiaceae, обращая особое внимание на “инструменты”, используемые в генетическом анализе. По мере необходимости мы привлекали и данные о более экзотических бактериях. Однако в основном обсуждение будет сосредоточено на *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*, *Agrobacterium* spp. и *Bradyrhizobium japonicum*.

Генетические исследования *Rhizobium* начались достаточно давно. Еще в 1954 г. были проведены исследования по трансформации (Balassa, 1954, 1957). Наличие систем конъюгации было показано в 60-х годах (Higashi, 1967), и в это же время были выделены различные типы мутантов. Работы по генетике ризобий и агробактерий интенсифицировались в 70-х — начале 80-х годов и привели к созданию ряда методик (замещение генов, системы введения транспозонов), которые

оказались очень полезными при изучении бактерий многих родов. Анализ этих микроорганизмов позволил выявить многие существенные детали организации бактериальных генов. В частности, ризобии были в числе первых микробов, изучение которых позволило отойти от парадигмы *Escherichia coli* (одна кольцевая хромосома), которая не оказалась универсальной для прокариот. И хотя генетическое изучение ризобий и агробактерий было направлено главным образом на механизмы симбиотической азотфиксации и трансформации растений, оно привело ко многим важным открытиям, касающимся природы бактериального генома, и к созданию ряда генетических инструментов и методик, представляющих общий интерес.

II. Генетические карты и организация генома

Хотя данные о наличии систем конъюгации у ризобий появились достаточно давно (Higashi, 1967; Neumann, 1968), они долгое время вызывали скептицизм, касавшийся, например, чистоты штаммов *R. lupini*, использованных Хейманном и соавторами (Beringer et al., 1980). Первые систематические работы по конструированию хромосомных карт *Rhizobium* и *Agrobacterium* были проведены с использованием плазмид широкого круга хозяев, таких как RP4 и ее производных, мобилизующих хромосому (Beringer, Hopwood, 1976; Meade et al., 1977; Kondorosi et al., 1977, 1980; Zurkowski, Lorkiewicz, 1978; Beringer et al., 1978a, 1978b; Megias et al., 1982; Nooykaas et al., 1982). Большинство маркеров, использованных в этих работах, составляли мутации ауксотрофности (обычно химически индуцированные) и спонтанные мутации устойчивости к антибиотикам. Были проведены также их тонкое картирование с помощью трансдуцирующих фагов (Casadesus, Olivares, 1979).

Наиболее важным итогом этих исследований стало построение кольцевых хромосомных карт у *S. meliloti*, различных биотипов *R. leguminosarum* и у *A. tumefaciens*. Для мобилизации хромосомы были использованы плазмиды широкого круга хозяев RP4 (или RK2) и их более эффективный дериват R68.45 (Haas, Holloway, 1976), которые обеспечили удовлетворительную частоту переноса генов. Сравнение построенных хромосомных карт показало сходное расположение аналогичных генов (колинеарность) для всех трех видов (Kondorosi et al., 1980; Nooykaas et al., 1982). Стимул для продолжения этой работы был в значительной степени утрачен после того, как выяснилась экстрахромосомная локализация большинства генов, контролирующих взаимодействие быстрорастущих ризобий с растениями. Однако интерес к картированию генов ризобий и агробактерий ожил после разработки ряда эффективных методов, таких как физическое картирование с применением электрофореза в пульсирующем поле, создание искусственных штаммов типа Hfr с использованием Tn5-Mob (Simon, 1984) или других аналогов данного транспозона (например, Tn5-oriT; Jakobson, Guiney, 1984). Однако конъюгационное картирование с использованием наборов инсерций Tn5-Mob (Osteras et al., 1989; Klein et al., 1992; Glazebrook et al., 1992) или путем трансдукции по сцепленным инсерциям Tn5 (Charles, Finan, 1990, 1991) оказалось удобным для быстрого построения хромосомных и плазмидных карт или для локализации новых мутаций.

Гель-электрофорез в пульсирующем поле позволил строить физические карты бактериальных геномов, основываясь на использовании редко-щеплящих рестриктаз. Затем с использованием мелко-щеплящих рестриктаз получали более тонкие карты, и в итоге оказалось возможным создать физические карты, коррелирующие с ранее полученными генетическими картами, используя гибридизацию с пробамми на клонированные гены или на встройки Tn5 с известной локализацией. К настоящему времени такая работа проведена для *S. meliloti* и *B. japonicum*. У первого вида с использованием соответствующих ферментов для расщепления генома (Sobral et al., 1991a, 1991b) путем электрофореза в переменном поле удалось получить физические карты трех основных компонентов генома — хромосомы и двух мегаплазмид (Honeycutt et al., 1993). Физическая карта pRmeSU47b (pExo) коррелировала с генетической картой этого репликона и определенный размер двух мегаплазмид хорошо согласовывался с данными, полученными путем трансдукционного картирования (Charles, Finan, 1991) и электронного микрофотографирования (Burkhardt et al., 1987). По мере добавления новых маркеров к физической карте, она становилась все более полезным инструментом, например, для использования упорядоченных космидных библиотек.

Физическая карта построена и для *B. japonicum*, у которых размер генома был определен путем суммирования размеров рестрикционных фрагментов с использованием гель-электрофореза в переменном поле (Sobral et al., 1991a; Kundig et al., 1993). Полученная физическая карта была использована для построения генетической карты путем встройки кассет, содержащих уникальные рестрикционные сайты, в 79 генов, для которых были известны функции, а в ряде случаев и последовательности. Полученная карта позволила определить положение многих генов, контролирующих симбиотическое взаимодействие, а также и других генов, таких как *groEL*, гены цитохромов и других компонентов дыхательных цепей. Однако на этих картах отсутствуют маркеры ауксотрофности, что обусловлено малым числом работ по их получению у *B. japonicum* (хотя некоторые Tn5-индуцированные ауксотрофы и были получены: Nom et al., 1984), а также отсутствием карт, полученных с использованием общепринятых методов. Эти работы показали наличие кольцевой хромосомы, которая является основным компонентом генома *B. japonicum*.

Пульс-электрофорез ДНК штамма C58 *Agrobacterium tumefaciens* выявил наличие ранее неизвестной конфигурации: хотя предыдущие исследования и позволили расположить все маркеры на единой кольцевой карте (Hooykaas et al., 1982), у этого штамма было показано наличие крупной линейной молекулы ДНК (Allardet-Servent et al., 1993). Присутствие на этом репликоне, имеющем размер 2100 т.п.н., генов рибосомных РНК, а также генов фосфоманнозо-изомеразы и метаболизма пролина, показало, что его следует считать второй (линейной) хромосомой, дополнительной к ранее картированной хромосоме, имеющей размер 3000 т.п.н. Ни один из маркеров, использованных ранее (Hooykaas et al., 1982), не мог быть локализован на этом линейном репликоне, в противном случае построение кольцевой карты было бы невозможным. Полные физические карты *Agrobacterium* до сих пор не получены. Не известно также, является ли такая структура генома уникальной для штамма C58 или она характерна для всех агробактерий.

Принимая во внимание данные факты, а также результаты предварительного картирования нескольких штаммов *R. leguminosarum* с использованием *Ceu-I* (Yost, Hynes, неопубликованные данные), можно составить общую картину организации генома у Rhizobiaceae (табл. 1). Необходимо отметить, что *B. japonicum* имеет наибольший в этом семействе размер генома и, наряду с миксококками, один из самых больших геномов, известных для прокариот (Kundig et al., 1993). Все представители данного семейства имеют геном, более крупный, чем у *E. coli*, и подразделение генома на несколько крупных репликонов является общей чертой всех Rhizobiaceae, за исключением *Bradyrhizobium*. Можно предположить, что линейный компонент генома штамма C58 *A. tumefaciens* по кодирующей способности соответствует мегаплазмидам *S. meliloti* и *R. leguminosarum*. Пока единственным доказательством этого является сходство генетических карт этих трех микроорганизмов (Hooykaas et al., 1982). Важная роль плазмид у этих организмов будет обсуждаться ниже, однако необходимо отметить, что полные рестрикционные карты нескольких Ti и Ri плазмид (Holsters et al., 1980; Depicker et al., 1980; Pomponi et al., 1983; Jouanin et al., 1986), а также нескольких

Таблица 1. Состав генома у различных представителей Rhizobiaceae

Виды	Хромосома	Плазмиды*	Общий размер генома, т.п.н.
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	3540 т.п.н., кольцевая	1340 т.п.н., 1700 т.п.н.	6600
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	8700 т.п.н., кольцевая		8700
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	3000 т.п.н., кольцевая,	450 т.п.н.,	5750
	2100 т.п.н., линейная	200 т.п.н.	
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	3200 т.п.н., кольцевая	Не менее 4, общий размер до 2400 т.п.н.	5600

*у многих штаммов присутствуют дополнительные криптические плазмиды

“симбиотических” плазмид *Rhizobium* (Prakash et al., 1981, 1982a, 1982b; Girard et al., 1991; Perret et al., 1991) уже получены и могут оказаться полезными во многих исследованиях.

II.A. СТРУКТУРА ГЕНОВ

Общие свойства генов у ризобий такие же, как и у других бактерий. Генные районы обычно идентифицируют в опытах по гибридизации и комплементации. После секвенирования ДНК открытые рамки считывания (ОРС) идентифицируют с помощью методов, основанных на использовании кодонов и на высоком % Г+Ц пар оснований в третьем положении кодона (Gribskov et al., 1984). Хотя эти методы весьма эффективны для выявления ОРС, было показано, что *nod* и *NifA*-регулируемые гены *B. japonicum* имеют меньший сдвиг в использовании кодонов и более низкое содержание Г+Ц, чем другие гены этого организма. Поэтому выявление *NifA*-регулируемых генов с использованием обычных таблиц частот кодонов может быть затруднено.

В этом разделе мы кратко рассмотрим данные о промоторах генов, которые скорее всего транскрибируются с помощью холофермента РНК-полимеразы, включающей основной вегетативный сигма-фактор SigA. Несмотря на то, что у представителей Rhizobiaceae секвенировано уже более 400 генов, сайты старта транскрипции выявлены лишь у немногих из них. Обычно гены ризобий плохо транскрибируются в *E. coli* (Fisher et al., 1987; Bae, Stauffer, 1991; Luka et al., 1996). Однако, из этого правила имеются исключения (например, *recA*: Better, Helinski, 1983). С использованием системы *in vitro* показано, что РНК-полимераза *S. meliloti*, которая узнает и точно считывает конститутивный промотор *nodD*, также точно иницирует и терминирует район промотора и лидера гена *trp E. coli*. Однако, РНК-полимераза *E. coli* не может вызывать транскрипцию промотора *nodD*. Недавно были определены кодируемые геном *rpoD* аминокислотные последовательности основного вегетативного сигма-фактора у *A. tumefaciens*, *S. meliloti* и *R. etli* (Segal, Ron, 1993; Rushing, Long, 1995; Luka et al., 1996). Эти последовательности оказались очень сходными между собой, однако отличались от последовательности SigA *E. coli* по 4 субрегионам в первом из 4 выявляемых доменов, что может быть связано с измененным узнаванием промоторов (Luca et al., 1996). В этой же работе выявлено сходство между последовательностями SigA Rhizobiaceae и *Caulobacter crescentus*. Гены последнего вида плохо транскрибируются в *E. coli* и недавно была опубликована последовательность его консенсусного промотора, составленная на основании анализа 12 последовательностей (Malakoot, Ely, 1995). Район -35 содержал последовательность 5'-TTGACGS-3', а район -10 — последовательность 5'-GCTANAWC-3' (Malakoot et al., 1995).

Анализ промотора *trpE(G)* *S. meliloti* показал, что мутации, повышающие сходство -10 региона с таковым для промотора *E. coli*, повышают и его транскрибируемость в *E. coli*. Например, транзигция С→Т в положении -9 повышает интенсивность транскрипции более чем в 1000 раз (Bae, Stauffer, 1991). Сила этого промотора в *S. meliloti* зависит от нуклеотидных изменений в предполагаемых районах -10 и -35, но не в спейсере, находящемся между ними. Сравнение промоторов *trpE(G)* (Bae et al., 1989), *nodD* (Fisher et al., 1987), *hemA-P1* и *hemA-P2* (Leong et al., 1985) позволило выявить высококонсервативный тример вблизи позиции -35 (5'-TTG-3'), однако вблизи позиции -10 консервативных последовательностей не обнаружено. Позднее были выявлены сайты старта транскрипции генов *ntrA* и *pckA* *S. meliloti* (Albright et al., 1989; Osteras et al., 1995): оба они содержали тример (5'-TTG-3') вблизи позиции -35.

Были определены сайты старта транскрипции *ropA* и его двух гомологов у различных биотипов *R. leguminosarum*, однако их анализ не позволил выявить консенсусных последовательностей (de Maagd et al., 1992; Roest et al., 1995). Определены промоторные районы нескольких оперонов *groESL* и *dnaK* у пурпурных α -протеобактерий, включая *A. tumefaciens*, *S. meliloti*, *B. japonicum* (Segal, Ron, 1995). Предварительно определенная последовательность, которая может составлять консенсус для -35 региона промотора генов теплового шока, выглядит как: -35-5'-CTTG-3'.

Гены рибосомных РНК (*rrn*) у *Bradyrhizobium japonicum* имеют типичную для бактерий организацию: 5'-*rrs*(16S рРНК)-*ileT*(тРНК^{иле})-*alaT*(тРНК^{ала})-*rrf*(23S рРНК)-*rrf*(5S рРНК)-3' (Kundig et al., 1995). Эти же авторы представили данные о гибридизации ДНК и показали, что у медленно-растущих ризобий обычно имеется одна копия генов *rrn*, а у быстрорастущих — три копии.

II.B. ПЛАЗМИДЫ

Как уже было отмечено, важным компонентом генома у многих представителей Rhizobiaceae являются крупные плазмиды. Еще в ранних работах по молекулярной характеристике быстрорастущих бактерий (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*) было показано, что крупные плазмиды играют важную роль в их взаимодействии с растениями. На плазмидах локализовано большинство генов *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*, контролирующих онкогенные свойства (Van Larebeke et al., 1974; Hooykaas et al., 1977; Holsters et al., 1980; Costantino et al., 1980; White et al., 1980a, 1980b), а также гены, контролирующие образование клубеньков и симбиотическую азотфиксацию у *R. leguminosarum* (все три биотипа), *R. etli*, *S. meliloti*. Практически для всех изученных быстрорастущих ризобий, за исключением *R. loti*, характерна плазмидная локализация “симбиотических” генов. Интересно, что хотя у *R. loti* (*Mesorhizobium loti*) отсутствуют плазмиды, содержащие *nif*- и *nod*-гены, выявлена локализация этих генов в составе мобильного участка ДНК, способного переноситься при конъюгации, что подразумевает переход генов в промежуточное внехромосомное состояние (Sullivan et al., 1995).

Методы, используемые для локализации “симбиотических” генов ризобий, включают гибридизацию с пробамми на *nif*-последовательности (Hombrecher et al., 1981; Banfalvi et al., 1981; Rosenberg et al., 1981), перенос плазмид в другие (несимбиотические) бактерии (Hirsch, 1979; Zurkowski, Lorkiewicz, 1979; Hirsch et al., 1980; Hooykaas et al., 1981) и изгнание плазмид (Zurkowski, 1982). Однако, многие плазмиды Rhizobiaceae не участвуют в контроле взаимодействия с растениями (Merlo, Nester, 1977; Hynes et al., 1989; Hynes, McGregor, 1990). Поскольку генетика клубенькообразования, онкогенности и симбиотической азотфиксации рассмотрена в последующих главах, мы сосредоточимся на методах изучения плазмид, роли крупных плазмид в эволюции, а также на их функциях, не связанных с симбиозом.

Плазмиды Rhizobiaceae названы “крупномолекулярными” в сравнении с такими репликаонами как F-фактор. Первоначальные оценки размера этих плазмид были занижены, но теперь мы знаем, что у некоторых представителей семейства (например, у *S. meliloti*) размер плазмид может достигать 1700 т.п.н. Для таких репликаонов был предложен термин “мегаплазида” (Rosenberg et al., 1982), который мы будем использовать для плазмид с размером около 1000 т.п.н., но не для плазмид порядка 300 т.п.н. Иногда эти плазмиды называют “мини-хромосомами”, однако их более правильно считать плазмидами, так как:

- 1) на них не выявлено генов, обязательных для выживания бактериальной клетки;
- 2) все изученные мегаплазмиды могут быть перенесены в неродственные бактерии, где относительно стабильно поддерживаются, не оказывая существенного влияния на реципиента;
- 3) могут быть получены штаммы, лишенные этих плазмид или несущие делеции, захватывающие более половины их размера.

Ниже мы подробно рассмотрим некоторые из этих данных, а также методы, использованные при их получении.

II.C. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИД

Поскольку мегаплазмиды по размеру ближе к хромосоме, чем к обычным плазмидам, таким как клонирующие векторы, их трудно выявить и выделить с использованием физических методов. Для Rhizobiaceae был разработан ряд особых методик визуализации и выделения плазмид. Многие из них базируются на использовании щелочных условий для денатурации и элиминации хромосомной ДНК (Ledeboer et al., 1976; Casse et al., 1979; Hirsch et al., 1980; Kado, Liu, 1981). При использовании этих методик в препаративном масштабе могут быть выделены большие количества плазмидной ДНК. Однако, при работе с плазмидами, имеющими размер свыше 200-300 т.п.н., их использование становится неудобным, а плазмиды размером более 400 т.п.н. вообще не могут быть выявлены. Методика, разработанная Швингхеймером (Schwinghammer, 1980), обеспечивает более аккуратный лизис клеток и при точном использовании позволяет выделять интактные мегап-

лазмиды (Burkhardt et al., 1987). Однако выход ДНК оказывается низким и процедура не удобна для скрининга большого количества штаммов.

Наиболее удобную методику для изучения плазмид крупного размера разработал Экхард (Eckhardt, 1978). Она основана на лизисе клеток в лунках агарозного геля и в отсутствие физического воздействия на лизат даже наиболее крупные репликоны остаются интактными, сохраняют ковалентно связанную кольцевую форму и могут мигрировать в гель. Методика Экхарда была впервые модифицирована для *S. meliloti* (Banfalvi et al., 1981; Rosenberg et al., 1981, 1982) и первоначально сочеталась с вертикальным расположением геля. Более удобная модификация, включающая горизонтальное положение геля, была разработана Р. Симоном в Билефельдском университете на основе ряда более ранних публикаций (Hynes et al., 1985, 1980; Hynes, McGregor, 1990). Детальный протокол может быть предоставлен по запросу М. Хайнесом. В нашей работе эта методика обеспечивает визуализацию репликонов размером от нескольких до 3000 т.п.н. (хромосомы *S. meliloti* и *A. tumefaciens*; для второго вида можно выделить кольцевую, но не линейную хромосому, так как линейные молекулы ДНК обычно не мигрируют в агарозный гель). Хотя из этого геля не может быть получена интактная ДНК, методику Экхарда можно использовать в препаративных целях, применяя либо легкоплавкую агарозу, либо некоторые дополнительные приемы для выделения ДНК из геля (например, GeneClean, Prep-a-Gene). При этом могут быть получены количества ДНК, достаточные для мечения плазмид путем ник-трансляции или использования случайных праймеров, а также для создания библиотек плазмидной ДНК. Кроме того, участки, содержащие плазмиды, могут быть вырезаны из геля, после чего ДНК подвергают рестрикции непосредственно в агарозе и извлекают из нее ДНК в переменном поле (Sanderson, Hynes, неопубликованные данные). Этот метод может обеспечить тонкое картирование индивидуальных плазмид.

II.D. КОНЬЮГАЦИЯ И ГРУППЫ НЕСОВМЕСТИМОСТИ

Хотя обычно считается, что крупные плазмиды способны к самостоятельному конъюгативному переносу, в случае *Rhizobium* и *Agrobacterium* это не всегда справедливо. Конъюгативность показана для ряда плазмид *R. leguminosarum*: pRL1JI, pRL3JI, pRL4JI (Hirsch, 1979), pRleVF39a, pRleVF39b (Hynes et al., 1988). Однако у исследованных штаммов обычно выявляют 4-8 плазмид, большинство из которых не переносится при конъюгации (Hynes et al., 1988). Поэтому необходимо признать, что большинство плазмид *Rhizobiaceae* либо неконъюгативны, либо для их переноса требуются особые условия. Последний сценарий особенно вероятен для Ti-плазмид *Agrobacterium*, перенос которых индуцируется опинами. Очевидно, что перенос некоторых плазмид ризобий и агробактерий возможен лишь при наличии специальных сигналов. Мы изучали эксудаты корней и семян гороха на способность стимулировать перенос плазмид, маркированных Tn5 и заведомо лишенных конъюгативности, у 3 различных штаммов *R. leguminosarum*, однако переноса с регистрируемой частотой выявлено не было. Возможно, эти опыты следует повторить *in situ*, на корневой системе растений. Имеются предварительные данные о самотрансмиссивности мегаплазмид *S. meliloti*, которая осуществляется с низкими частотами (Charles PhD; Banfalvi et al., 1985). Возможна взаимосвязь между редко встречающимися самотрансмиссивными плазмидами *R. leguminosarum* и чувствительностью к малым бактериоцинам, а также способностью подавлять их синтез (Wijfelman et al., 1983). Впоследствии было показано, что эти бактериоцины являются аутоиндукторами, аналогичными лактону гомосерина, синтез которого кодируется гомологами гена *luxI* (Gray et al., 1996; Schripsema et al., 1996). Однако остается неясным, почему они могут быть ингибиторами роста для штаммов, несущих конъюгативные плазмиды.

Спектр хозяев плазмид *Rhizobium* включает *Agrobacterium*, поскольку все изученные плазмиды могли реплицироваться в бесплазмидных штаммах агробактерий (Rosenberg, Huguet, 1984; Hynes et al., 1985), которые являются удобными реципиентами для манипулирования плазмидами ризобий. Плазмиды *Agrobacterium* могут реплицироваться в *Rhizobium* (Hooykaas et al., 1977; O'Connell et al., 1987). Плазмиды агробактерий нопалинового типа (Ti), как и Sym-плазмиды *R. leguminosarum*, могут поддерживаться и индуцировать опухолеообразование или клубенькообразование в

Phyllobacterium (van Veen et al., 1988). По-видимому, ризобии, агробактерии, а возможно и некоторые другие почвенные бактерии имеют общий пул плазмид.

Показана несовместимость ряда плазмид *Rhizobium* и *Agrobacterium* (Rosenberg, Huguet, 1984; Hynes et al., 1985; O'Connell et al., 1987), а также сходство ориджинов репликации некоторых из этих плазмид (Turner, Young, 1995; Turner et al., 1996). Эти работы затруднены тем, что большинство штаммов имеет несколько плазмид, и введение новых плазмид вызывает перестройки или элиминацию, связанную с несовместимостью.

Учитывая трудности, связанные с несовместимостью плазмид, следует признать перспективной гибридизацию с клонированными ориджинами репликации. Несколько таких ориджинов было клонировано для мегаплазмид *S. meliloti* (Margoulin, Long, 1993), несимбиотической плазмиды *S. meliloti* (Mercado-Blanco, Olivares, 1994a, 1994b), а также для *Rhizobium "hedysarum"* (Mozo et al., 1990) и *R. leguminosarum* (Turner, Young, 1995; Turner et al., 1996). Ряд ориджинов был выделен из плазмид *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes* (Gallie et al., 1984, 1985a; Vilaine, Casse-Delbart, 1987; Gallie, Kado, 1988; Tabata et al., 1989; Gerard et al., 1992). Была показана консервативность ряда генов *repC* у *Rhizobium*, *Sinorhizobium* и *Agrobacterium*. Близкая гомология этого локуса может быть связана с несовместимостью, тогда как для совместимых плазмид характерно наличие дивергировавших локусов. В идеале, необходимо проклонировать и использовать в качестве гибридизационных проб ориджины репликации широкого круга плазмид Rhizobiaceae (включая плазмиды таких штаммов *R. leguminosarum* как JB300 и VF39). Будет неудивительно, если на этих плазмидах обнаружатся множественные ориджины репликации. Показано, что ориджин репликации, клонированный из плазмиды pExo *S. meliloti*, не является единственным (Margolin, Long, 1993).

II.E. ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ МАНИПУЛИРОВАНИЯ ПЛАЗМИДАМИ

Общими свойствами плазмид Rhizobiaceae являются крупные размеры, стабильность и не-трансмиссивность, что говорит в пользу их важности для бактерий. Однако, конкретные функции для многих из этих плазмид установить пока не удалось, и многие из них до сих пор считаются криптоическими.

В течение последнего десятилетия создано несколько удобных орудий для манипулирования плазмидами Rhizobiaceae. Одним из лучших является транспозон Tn5-Mob (Simon, 1984), содержащий ориджин репликации плазмиды широкого круга хозяев RP4, встроенный в транспозон Tn5 (включая окружающий район ДНК, который в совокупности обозначен как Mob-сайт). Любой репликон, несущий Tn5-Mob, может быть перенесен в другие штаммы при использовании плазмиды RP4 в качестве "помощника". Хромосомные инсерции Tn5-Mob представляют собой эффективные доноры типа Hfr (Simon, 1984), тогда как плазмиды, несущие инсерции, могут быть целиком перенесены путем конъюгации. В результате такого переноса зачастую удается выяснить функцию плазмиды (Brewin et al., 1980; Hirsch et al., 1980; Hooikaas et al., 1981; Hynes et al., 1986), но этот подход имеет некоторые ограничения. Если во всех штаммах изучаемого вида имеются сходные плазмиды, выяснить их функции путем переноса часто оказывается невозможным. Если реципиентом плазмиды является неродственный штамм (например, бесплазмидная агробактерия), то фенотип, кодируемый плазмидой, может оказаться криптоическим из-за того, что он не проявляется на генетическом фоне нового хозяина.

Наиболее простым и быстрым способом выяснения функции плазмиды является ее элиминация из исходного штамма. Хотя имеется ряд сообщений об изгнании нодуляционных плазмид из ризобий (Zurkowsli, 1982) и плазмид онкогенности из агробактерий (Lin, Kado, 1977) с использованием общепринятых методов, таких как воздействие повышенной температурой и этидиумбромидом, оказалось, что многие плазмиды Rhizobiaceae являются стабильными и не поддаются элиминации. В связи с этим был сконструирован транспозон Tn5-Mob, несущий условно-летальный ген *sacB* *Bacillus subtilis* (Hynes et al., 1989). Этот транспозон может быть использован для маркирования плазмид и их последующего изгнания при культивировании на сахарозе (Hynes et al., 1989; Hynes, McGregor, 1990; Baldani et al., 1992). Имеются производные, содержащие маркеры устойчивости к неомицину, тетрациклину и гентамицину (Hynes et al., 1989; Quandt, Hynes, неопубли-

кованные данные), которые были широко использованы для изгнания плазмид у *R. leguminosarum*, *S. meliloti*, *R. huakuii*, *R. galegae* и *Agrobacterium*. Сходные конструкции использованы для изгнания плазмид у *R. etli* (Brom et al., 1992). Даже если плазмиды оказываются очень устойчивыми к использованию этой методики изгнания, обычно возникают мутанты, несущие обширные делеции каждой плазмиды. Иногда удается получить штаммы, лишенные нескольких плазмид, и даже описан мутант *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, у которого все плазмиды были удалены путем повторного использования данной методики (Moenne-Loccoz et al., 1995). Интересным выводом из этих работ является то, что у *R. leguminosarum* и *R. etli* в контроле симбиотического взаимодействия может участвовать несколько плазмид, причем наиболее крупная из них часто важна для оптимального роста. Изгнание или делеции этих плазмид могут существенно нарушить рост бактерий (Hynes, McGregor, 1990; Brom et al., 1992; Moenne-Loccoz, Weaver, 1995a, 1995b). Опыты по излечиванию от нескольких плазмид, которые затем переносили в мутантный штамм с помощью производных транспозона, требуют наличия множественных маркеров антибиотикоустойчивости. Поэтому были сконструированы серии транспозонов, содержащих широкий спектр маркеров, таких как устойчивость к рутути, хлорамфениколу, гентамицину, спектиномицину (Quandt, Hynes, в печати).

Для особенно крупных плазмид, таких как мегаплазмиды *S. meliloti*, одноступенчатая процедура изгнания с помощью гена *sacB* неэффективна, в связи с чем получают делеционные варианты, в которые опять вводят транспозон, повторно отбирают мутанты на сахарозе, что позволяет получить очень большие делеции (Hynes et al., 1989) и даже полностью бесплазмидные варианты (Hynes, Yost, неопубликовано).

Другой подход для характеристики крупных репликонов предложили Charles и Finan (1990, 1991), которые сконструировали карту мегаплазмиды pRmeSU47b (1700 т.п.н.), состоящую из участков, несущих инсерции разных производных Tn5, взаимное расположение которых определяют посредством трансдукции. Затем путем гомологичной рекомбинации между элементами IS50 из различных инсерций, фланкирующих разные участки мегаплазмиды (160-600 т.п.н.) были получены большие делеции определенных участков. Выявление таких делеций облегчалось путем использования производных Tn5, которые конститутивно экспрессировали ген *lacZ*, что облегчало отбор колоний на основании белой или голубой окраски. Некоторые делеции были получены у штаммов, содержащих инсерции в цис-положении, причем частота рекомбинации, зависимой от IS50, увеличивалась при трансдукции инсерции транспозона в сайт реципиентного штамма, содержащий инсерцию в удаленном сайте.

II.F. ФЕНОТИПЫ, ОПРЕДЕЛЯЕМЫЕ ПЛАЗМИДАМИ

По мере характеристики все новых плазмид *Rhizobium* и *Agrobacterium*, а также выявления разнообразных плазмидных генов, изменяется точка зрения на эти плазмиды как на "необязательные" генетические элементы. Хотя плазмиды часто не являются абсолютно необходимыми для поддержания чистых культур бактерий в условиях лаборатории, они оказываются очень важными для жизни бактерий в естественных условиях, где они вынуждены конкурировать с другими бактериями и взаимодействовать с растениями (Moenne-Loccoz, Weaver, 1995a, 1995b, 1996). Помимо генов, непосредственно участвующих во взаимодействиях с растениями (*nod*, *nif*, *fix* у *Rhizobium*; *vir*, Т-ДНК у *Agrobacterium*), большое количество фенотипических свойств Rhizobiaceae кодируется плазмидными генами. К их числу относятся гены катаболизма (табл. 2), транспорта дикарбоксилатов (Finan et al., 1988; Watson et al., 1988), синтеза экзополисахаридов (Hynes et al., 1986; Finan et al., 1986), тиамина (Finan et al., 1986), липополисахаридов (Hynes, McGregor, 1990; Brom et al., 1992; Baldani et al., 1992), транспорта и утилизации фосфатов (Bardin et al., 1996), синтеза бактериоцинов (Hirsch et al., 1980; Wijffelman et al., 1983), синтеза меланина (Lamb et al., 1982; Hynes et al., 1988; Mercado-Blanco et al., 1993). Однако имея в виду, что плазмиды могут составлять до 40% генома и что некоторые штаммы могут содержать до 10 крупных плазмид, очевидно, что пока охарактеризована лишь небольшая часть плазмидных генов. Большинство работ проведено с агробактериями и быстрорастущим ризобиям, по которым опубликован ряд обзоров (Mercado-Blanco, Toro, 1996; Garcia de los Santos et al., 1996). Плазмиды часто встречаются у *B. japonicum*

Таблица 2. Примеры генов катаболизма, расположенных на плазмидах

Источники углерода	Плазмиды	Бактерии	Ссылки
Различные опины	Различные Ti- и Ri-плазмиды	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>A. rhizogenes</i>	Глава 9
Орнитин	pRmGR4b, pRlcVF39f	<i>S. meliloti</i> , <i>R. leguminosarum</i>	Soto et al., 1994*
Ризопины	pRme220-3a	<i>S. meliloti</i>	Saint et al., 1993
Тригонеллин	pRme2011a	<i>S. meliloti</i>	Boivin et al., 1990
Стакгидрин	pRme2011a	<i>S. meliloti</i>	Goldman et al., 1994
Каллистегин	pRme41a	<i>S. meliloti</i>	Tepler et al., 1988*
Рамноза	pRlcW14-2c, pRlcVF39e	<i>R. leguminosarum</i>	Baldani et al., 1992*
Сорбитол	pRlcW14-2c, pRlcVF39e	<i>R. leguminosarum</i>	Baldani et al., 1992
Адонитол	pRlcW14-2b, pRlcW8-7c, pRlevf39d	<i>R. leguminosarum</i>	Baldani et al., 1992*
Глицерол	pRlcW14-2a, pRlcW8-7b, pRlcVF39c	<i>R. leguminosarum</i>	Baldani et al., 1992*
Рафиноза	pRmeSu47b	<i>S. meliloti</i>	Charles et al., 1991
Мелибиоза	pRmeSu47b	<i>S. meliloti</i>	Charles et al., 1991
Дульцитол	pRmeSu47b	<i>S. meliloti</i>	Charles et al., 1991
Арабиноза	pRlcW11-9b	<i>R. leguminosarum</i>	Baldani et al., 1992
Протокатехат	pRmeSu47b	<i>S. meliloti</i>	Charles et al., 1991
Катехол	pRlcW14-2d, pAMG1	<i>R. leguminosarum</i> , <i>R. sp.</i>	Baldani et al., 1992; Gajendiran, Mahavedan, 1990

*Имеются также неопубликованные данные из лаборатории М. Хайнеса

(Luyindula et al., 1975; Gross et al., 1979). Однако у этих бактерий плазмиды не играют существенной роли в симбиозе с растениями, а другие их функции пока неясны.

Важным достижением в изучении плазмид ризобий стала публикация полной последовательности симбиотической плазмиды штамма NGR234 *Rhizobium* sp., обладающего широким спектром хозяев (Freiberg et al., 1997). Эта плаزمида (pNGR234a) имеет размер более 536 т.п.н. и ее последовательность имеет ряд интересных черт. Около 18% этой плазмиды составляют IS-подобные элементы, предполагаемые интегроны и другие мобильные структуры, что наряду с варьированием содержания ГЦ-пар, свидетельствует о мозаичном происхождении данного репликона. Эта плазмида содержит многие *nod*-, *nif*- и *fix*-гены, однако у данного штамма *Rhizobium* гены *fixLJ*, *fixK*, *fixNOPQ* и *fixGHIS* локализованы в хромосоме. На плазмиде обнаружен целый ряд открытых рамок считывания, которые могут участвовать в контроле секреции белков и синтеза полисахаридов — процессов, связанных с развитием симбиоза. Однако, это участие не является обязательным. Например, гены секреции белков могут быть связаны с экспортом бактериоцинов или внесклеточных ферментов, играющих роль в почвенных и ризосферных взаимодействиях. Последовательность Sym-плазмиды pNGR234a показывает, что ориджин репликации этой плазмиды консервативен для ризобий и агробактерий. В частности, гомология с ориджином репликации Ti-плазмид *Agrobacterium* говорит о возможной конъюгативности Sym-плазмиды pNGR234a, что и было подтверждено экспериментально.

Авторы провели также транскрипционный анализ значительной части (137 т.п.н.) данной плазмиды. Пробы РНК готовили из обработанных индукторами *nod*-генов свободноживущих клеток, выращенный в жидкой культуре, а также из бактериоидов. Такой подход может оказаться ценным для выявления новых симбиотических генов. Другим подходом для решения этой задачи является изучение генов, сцепленных с вновь выявленными промоторами типа *nod-box*.

Возможно, что данная публикация инициирует определение последовательностей и других репликонов Rhizobiaceae. Однако после этого потребуются большая дополнительная работа по изучению функций вновь открытых генов. По-видимому, многие из этих генов не будут иметь отношения к симбиозу с растениями. Это видно уже из того, что большие участки мегаплазмид *S. meliloti* могут быть делетированы без видимого фенотипического эффекта (Hynes et al., 1989; Charles, Finan, 1991). По-видимому, мутации во многих плазмидных генах имеют трудно детектируемые эффекты, и поэтому изучение функций данных генов затруднено.

III. Перенос генов и рекомбинация

III.A. ТРАНСДУКЦИЯ

Трансдукцией называют перенос ДНК от одной бактерии к другой посредством фагов. Ограниченная хозяйская специфичность большинства фагов может сочетаться с общей трансдуцирующей активностью у некоторых фагов *S. meliloti* (Kowalski, 1967; Casadesus, Olivares, 1979a; Sik et al., 1980; Martin, Long, 1984; Finan et al., 1984). У *R. leguminosarum* выявлен фаг RL38, осуществляющий общую трансдукцию между штаммами разных биотипов (Buchanan-Wollaston, 1979). Этот фаг может инфицировать и некоторые штаммы *R. etli* (Hynes, Oresnik, не опубликовано). У *R. leguminosarum* и *S. meliloti* использование трансдуцирующих фагов оказалось очень эффективным для конструирования штаммов, несущих множественные мутации. Трансдукция с использованием лизатов из независимых колоний, полученных путем случайных инсерций фага, может быть использована для выявления встроок транспозона, сцепленных с любой аллелью. На практике оказывается достаточным проанализировать 100 трансдуктантов *S. meliloti* для того, чтобы выявить инсерцию транспозона, сцепленную с изучаемой аллелью (Finan et al., 1984). Например, генетический анализ спонтанных мутаций, супрессирующих симбиотический фенотип Fix мутантов *ndvF*, оказался достаточным для выявления сцепленных инсерций (Oresnik et al., 1994). Трансдукция из пулов библиотек, полученных из тысяч случайных инсерций, была использована для конструирования полной генетической карты мегаплазмиды *pExo S. meliloti*, имеющей размер 1700 т.п.н. Опубликованы также котрансдукционные карты участков хромосом *R. leguminosarum* и *S. meliloti* (Casadesus, Olivares, 1979; Glazebrook et al., 1992).

Был охарактеризован *l*-подобный фаг 16-3, лизогенизирующий штамм Rm41 *S. meliloti* (Svab et al., 1978). Авторы создали физическую и генетическую карты этого фага, идентифицировали и секвенировали сайты его прикрепления, что привело к созданию векторов, обеспечивающих стабильную интеграцию одиночных генов с помощью Rm41 (Hermesz et al., 1992; Dorgai et al., 1993). К сожалению, узкая специфичность фага 16-3 не позволила использовать его для широкого спектра штаммов *S. meliloti*.

III.B. ТРАНСФОРМАЦИЯ

Трансформацией называют стабильное включение в бактериальную клетку поглощенной ДНК. Имеются многочисленные сообщения о трансформации у представителей Rhizobiaceae (Balassa, 1954; Raina, Modi, 1971; O'Gara, Dunican, 1973; Drozanska, Lorkiewicz, 1978; Selvaraj, Iyer, 1981; Courtious et al., 1988). Однако, эти методики редко используются в генетическом анализе бактерий. Это может быть связано как с низкой воспроизводимостью получаемых результатов (Courtious et al., 1988), так и с простотой введения плазмид в ризобии путем конъюгации. Позднее были

получены данные о возможности введения ДНК в *Agrobacterium* spp. и *Bradyrhizobium japonicum* путем электропорации (Shen, Ford, 1989; Hattermann, Stracey, 1990; Charles et al., 1994). В настоящее время электропорация широко используется для введения плазмид в агробактерии, и показана возможность ее использования для переноса хромосомных маркеров между разными штаммами (Charles et al., 1994).

III.C. КОНЬЮГАЦИЯ

Конъюгация, представляющая собой перенос ДНК между бактериями при их непосредственном контакте, является общей генетической методикой, используемой для Rhizobiaceae. На практике донор, реципиент и (при проведении трехродительских скрещиваний) штамм с мобилизующей плазмидой смешиваются и наносятся на поверхность агаризованной среды. После ночного инкубирования смесь штаммов помещают на селективную среду для выявления искомым рекомбинантов. Конъюгацию используют для: а) переноса банков генов и других рекомбинантных клонов из *E. coli*; б) введения транспозонов из *E. coli* в Rhizobiaceae; в) создания генетических карт определенных штаммов; г) переноса симбиотических, онкогенных и других плазмид между штаммами.

Многие плазмиды широкого круга хозяев, принадлежащие к группам несовместимости IncP, IncW, IncQ реплицируются в бактериях Rhizobiaceae. Наиболее популярными клонирующими векторами являются производные плазмиды RK2 группы IncP и описанные в разделе “Векторы и другие генетические инструменты” данной статьи. Все эти производные содержат ориджин переноса RK2 (*oriT*) и при этом не имеют района, содержащего *tra*-гены (20 т.п.н.). Эти *tra*-гены были клонированы в плазмиде узкого круга хозяев ColEI, что привело к созданию плазмиды pRK2013 (Figurski, Helinski, 1979), широко используемой для мобилизации различных векторов плазмид из *E. coli* в различные грам-отрицательные бактерии. В качестве альтернативы этой трехродительской системе, исследователи обычно сначала вводят плазмидные клоны прямо в мобилизующие штаммы SM10 или S17-1 *E. coli*, которые содержат *tra*-гены RK2, встроенные в хромосому (Simon et al., 1983, 1986).

III.D. СИСТЕМЫ РЕСТРИКЦИИ И МОДИФИКАЦИИ

Учитывая объем работы, проделанной в области генетики Rhizobiaceae, представляется удивительным, насколько мало известно о системах рестрикции и модификации этих бактерий. Исходя из важности защиты от инфекции фагами, можно предположить широкое распространение этих систем. Модификация фаговой ДНК у *Rhizobium* подразумевает наличие у большинства штаммов барьера для инфекции (Finan et al., 1984; Martin, Long, 1984; Swinton et al., 1985). Поиск данных в компьютерной базе Новых Английских Биологических Лабораторий (адрес: <http://www.neb.com/rebase/index.html>) показал наличие 7 форм ризобий (несколько видов *S. meliloti*, *R. leguminosarum*, “*R. lupini*”) и 9 форм *Agrobacterium*. Большинство ферментов не опубликовано и для многих не известна специфичность по отношению к последовательностям. Имеются также изоизомеры групп SalI, NaeI, ClaI, BclI, BamHI, EcoRII. Единственным коммерчески доступным ферментом Rhizobiaceae является AgeI из морского изолята *Agrobacterium gelatinivorum* (Mizuno et al., 1990). Некоторые ссылки, приводимые в REBASE, относятся к патентам, но в некоторых публикациях имеются ссылки на фермент *Agrobacterium*, сходный с EcoRII (Le Bon et al., 1978) и с RleAI, новым ферментом *R. leguminosarum*, который узнает асимметричный сайт (Vesely et al., 1990). Фермент, подобный PstI, кодируется плазмидой pRleVF39b у штамма VF39 *R. leguminosarum* (Rochepeau et al., 1997). Возможно, что системы рестрикции-модификации широко распространены у Rhizobiaceae, но поскольку большинство работ выполнено с применением конъюгации, эти системы не были выявлены и изучены. До сих пор не выявлены системы рестрикции у *Bradyrhizobium* и *Agrobacterium*. В некоторых работах показана роль рестрикции-модификации в контроле хозяйской специфичности фагов, частот переноса генов при трансдукции и электропорации (Buchanan-Wollaston, 1979; Selvaraj, Iyer, 1981; Hattermann, Stacey, 1990). Например,

фаг fM12h1 *S. meliloti* проявлял сниженную литическую активность на штаммах Rm41 или SU47 в зависимости от того, на каком из них был выращен фаг. Более того, воздействие фагом Rm41 на клетки в течение 3 часов при 42°C увеличивало литическую активность и частоту трансдукции в 100 раз, если фаг выращивали на штамме SU47, что может быть связано с температурной инактивацией системы рестрикции (Williams et al., 1989).

III.E. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ

Генетическая рекомбинация между гомологичными генами характерна для Rhizobiaceae, в противном случае ранее упоминавшиеся процессы (трансдукция, картирование при конъюгации, замещение генов) были бы невозможны. Однако, механизмы генетической рекомбинации до сих пор не изучены. Мутанты, дефектные по рекомбинации, и гены *recA* идентифицированы у *Agrobacterium* (Klapwijk et al., 1979; Farrand et al., 1980), *S. meliloti* (Better, Helinski, 1983; Selbitschka et al., 1991), *R. etli* (Martinez-Salazar et al., 1991; Michiels et al., 1991) и *R. leguminosarum* (Selbitschka et al., 1991). Мутанты по гену *recA* имеют резко сниженную рекомбинационную активность и чувствительны к УФ-лучам. Соответствующие гены функционально комплементарны гомологичным генам *E. coli*. Регуляция гена *recA* *Agrobacterium* и некоторых видов ризобий связана с индукцией повреждениями ДНК (Riera et al., 1994).

Одна из загадок рекомбинационных систем агробактерий и быстрорастущих систем ризобий состоит в том, что большое количество повторов ДНК не вызывает интенсивных перестроек генома. С момента выявления множественных повторов ДНК (Flores et al., 1987) и до настоящего времени показано, что некоторые гены являются многократно повторенными как на плазмидах, так и на хромосоме. У *B. japonicum* выявлены множественные копии некоторых генов (*groESL*, *rpoN*; Kundig et al., 1993), однако в целом у этих бактерий уровень повторяемости генов намного ниже. Можно предположить, что: а) рекомбинация происходит постоянно, однако против нее действует отбор, повышающий стабильность генома; б) системы рекомбинации малоэффективны. Имеются определенные данные в пользу амплификаций и делеций определенных сегментов генома *R. etli* (Romeo et al., 1995), происходящего посредством систем *recA*. Ситуация может быть подобна той, которая характерна для некоторых энтеробактерий, у которых возможна рекомбинация между различными копиями оперона *rrn* (один из немногих повторяющихся локусов у *Salmonella* и *Escherichia*), однако жизнеспособны лишь немногие возникающие геномные конфигурации, которые оказываются консервативными (Sanderson, 1976; Krawiec, Riley, 1990). Мы получили данные о низкой частоте рекомбинации у *R. leguminosarum* и о необходимости наличия для этого обширных гомологичных последовательностей (Quandt, Hynes, 1993). В некоторых опытах по замещению генов показана необходимость наличия фланкирующих последовательностей размером более 1 т.п.н. для того, чтобы получить рекомбинанты. Показано, что при наличии двух копий одного гена (например, *fixNOPQ* или *fixGHIS*) одна из них не замещает другую (Mitsch, 1995), что говорит о необходимости точной гомологии. Сходным образом, когда клон, содержащий инсерцию в гене катаболизма адонитола, был введен на векторе-самубийце pJQ200 в несколько штаммов *R. leguminosarum* (Quandt, Hynes, 1993), замещение генов происходило только в том штамме, из которого были выделены клоны, тогда как в других штаммах рекомбинация происходила с частотой, намного более низкой, чем транспозиция Tn5, и не могла быть зарегистрирована (Faas, 1995). Поэтому возможно, что несмотря на высокую частоту повторов, выявляемую в геномах *Agrobacterium* и *Rhizobium*, природа систем рекомбинации и селективное давление в пользу определенного порядка генов и конфигурации генома делают его структуру эволюционно стабильной.

III.F. ИНСЕРЦИОННЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ И ТРАНСПОЗОНЫ

Одной из особенностей, которые могут обуславливать большое количество повторяющихся ДНК в геноме Rhizobiaceae, является присутствие инсерционных элементов (IS) и транспозонов,

а также других повторяющихся последовательностей и IS-подобных элементов. Множество IS-элементов было выделено из *Rhizobium* и *Agrobacterium*, многие из них полностью секвенированы, в т.ч.: 4 из *R. leguminosarum*, 6 из *S. meliloti*, 1 из "*R. lupini*" и 13 из *Agrobacterium* spp. (табл. 3). У ризобий также выявлен ряд IS-подобных элементов и повторяющихся последовательностей (Kaluza et al., 1985; Ramseier, Gottfert, 1991; Osteras et al., 1995).

IS-элементы идентифицируют разными способами: по выявлению мутаций в специфичных локусах (Ruvkun et al., 1982; Dusha et al., 1987), а также путем секвенирования и гибридизации. Были проведены работы по выявлению IS-элементов с помощью специальных векторов. Первым из них был вектор, содержащий ген *sacB*, позволивший выделить IS-элемент у *Agrobacterium* (Gay et al., 1985). Для выявления IS-элементов у *S. meliloti* и *R. leguminosarum* были использованы три системы (*pheS*, *sacB*, *rpsL*), основанные на инактивации генов, благодаря которой можно провести селекцию (Simon et al., 1991). Эти системы позволили выявить 17 IS-элементов: 16 у *S. meliloti* и 1 у *R. leguminosarum*. Лишь 1 из них оказался дуплицированным и только 1 (ISRm2011-1) соответствовал ранее выявленному элементу (ISRm1). Интересным оказался тот факт, что специфичность выявляемых IS-элементов зависела от использованной системы.

Использование выявленных элементов в качестве проб в гибридизационных опытах показало, что они могут служить для идентификации штаммов. Некоторые элементы присутствовали в большинстве или во всех изученных штаммах *S. meliloti* (например, Rm2011-2 — во всех штаммах, Rm2011-1 — во всех кроме одного, Rm2011-3 — во всех кроме двух), тогда как распространение других элементов было более ограничено. Копийность IS-элементов варьировала от 1 до 15 на штамм.

Этот же набор векторов был впоследствии использован для выявления и других транспозонподобных элементов (Ulrich, Puhler, 1994; Mazurier et al., 1996). Работы по изучению распространения IS-элементов в популяциях показали, что многие из них могут быть выявлены у представителей разных родов *Rhizobiaceae* (Wheatcroft, Watson, 1988; Selbitschka et al., 1995; Mazurier et al., 1996). Учитывая большое количество имеющихся IS-элементов, выявленных у *Rhizobiaceae*, можно предположить, что они играют важную роль в эволюции геномов этих бактерий.

IV. Векторы и другие генетические инструменты

Краеугольным камнем большинства работ по генетике *Rhizobiaceae* является использование плазмид широкого круга хозяев, кодирующих устойчивость, таких как RP4 (также RK2 и RP1), которые могут быть перенесены в ризобии и агробактерии и реплицируются в этих хозяевах (Beringer, 1974). Это позволило провести генетическое картирование и послужило основой для создания целой серии векторов, которые могут быть мобилизованы в широкий круг грам-отрицательных бактерий путем конъюгации. Мобилизуемые векторы разделяются на два класса: 1) реплицируемые в различных представителях *Rhizobiaceae* и используемые для комплементации мутаций и изучения эффекта многокопийности генов в разных хозяевах, 2) не реплицирующиеся в организме-хозяине (векторы-самоубийцы) и используемые для доставки транспозонов и для замещения генов.

IV.A. ВЕКТОРЫ, РЕПЛИЦИРУЮЩИЕСЯ В КЛЕТКЕ-МИШЕНИ

Первые векторы, созданные для ризобий и агробактерий, были уменьшенными производными плазмиды RK2, кодирующей устойчивость к тетрациклину. Плазмида pRK290 является примером таких векторов, который (или его производные) широко используют в генетике *Rhizobiaceae* (Ditta et al., 1980, 1985). Поскольку одной из основных областей применения реплицирующихся векторов является клонирование генов по комплементации, космиды широкого круга хозяев оказались наиболее удобными для таких опытов. Первый из таких векторов, pLAFRI (Friedman et al., 1982) был получен из pRK290 и использован для клонирования *nod*-генов *S. meliloti* (Long et al.,

Таблица 3. Транспозируемые элементы Rhizobiaceae в базе данных последовательностей ДНК

Элемент	Число пар нуклеотидов	Клон#	Ссылки
<i>Agrobacterium</i>			
IS136	1648	X04282	Vanderleyden et al., 1986
IS426	1319	X56562	Watson, Wheatcroft, 1991
IS1312	1317	U19148	Deng et al., 1995
IS292	2494	L29283	Ponsonnet et al., 1995
IS66	2608	M10204	Machida et al., 1984
IS870	1152	Z18270	Fournier et al., 1989
IS866	2716	M25805	Bonnard et al., 1989
IS869	863	X53945	Paulus et al., 1991
IS1131	2888	M82888	Wabiko, 1992
<i>Sinorhizobium meliloti</i>			
ISRm1	1319	X56563	Watson, Wheatcroft, 1991
ISRm2	-	M15786	Dusha et al., 1987
ISRm3	1298	M60971	Wheatcroft, Laberge, 1991
ISRm4	991	X65471	Soto et al., 1992
ISRm5	1340	U08627	Laberge et al., 1995
ISRm6	1269	X95567	Zekri, Toro, 1996
ISRm2011-2	1073	U22370	Selbitschka et al., 1995
<i>Rhizobium leguminosarum</i>			
ISR12	932	Z37965	Mazurier et al., 1996
ISRle39a	892	X99520	Rochepeau et al., 1997
ISR11	2495	L19560	O'Brein et al., 1993
Tn163	4605	L14931	Urlich, Puhler, 1994
<i>"R. lupini", Rhizobium sp.</i>			
ISR1	1260	X06616	Priefer et al., 1989
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>			
RSRjalpha9	1126	X02581, M11150	Kaluza et al., 1995
RsRjbeta9	≈ 950	M11149	Kaluza et al., 1985
<i>R. fredii</i>			
Isrf1	1001	Y08939	Vinardell et al., 1996

Примечание. Недавно опубликованная последовательность плазмиды штамма NGR234, обладающего широким спектром хозяев, состоит на 18% из инсерционных элементов, транспозаз и мозаичных последовательностей (Freiberg et al., 1997). Номер клона полной последовательности U00090. Эти последовательности не включены в таблицу, поскольку пока неясно, какие из них являются функциональными IS-элементами.

1982). Последовавшее улучшение этого вектора состояло в добавлении множественных сайтов для клонирования и фрагмента *lacZ* *E. coli*, обеспечившего возможность селекции рекомбинантов по окраске колоний (Staskawicz et al., 1987; Jones, Gutterson, 1987). В векторах pMP220 и pMP190 *lacZ* был использован для мониторинга экспрессии генов (Spaink et al., 1987). Эти векторы функционально активны в широком круге грам-отрицательных бактерий, включая всех представителей Rhizobiaceae.

Однако, при проведении некоторых экспериментов необходимы векторы малого размера (pRK290 и pLAFRI имеют размер около 20 т.п.н.) и новые маркеры антибиотикоустойчивости, а в некоторых случаях — векторы, совместимые с производными RK2, что необходимо для одновременного изучения действия нескольких генов. Поэтому для работы с Rhizobiaceae было создано несколько новых наборов векторов, основанных на различных репликаонах. Например, на основе репликаона pSa (IncW группа) созданы космиды и плазмидные векторы, используемые для *Rhizobium* и *Agrobacterium* (Gallie et al., 1985b). Векторы, полученные на основе RSF1010 (IncQ) оказались также удобными для работы с *Rhizobium* и *Agrobacterium* (Priefer et al., 1985; Labes et al., 1990). Был создан набор векторов, удобных для получения генных слияний и изучения экспрессии индуцибельных генов (Labes et al., 1990). В совокупности эти векторы представляют несколько альтернатив для проведения опытов, целью которых является клонирование, изучение комплементации и функций генов ризобий и агробактерий. Однако, представляется необходимым улучшить доступность рестрикционных сайтов, а также расширить спектр возможных маркеров антибиотикоустойчивости. Поскольку плазмида RSF1010 и ее производные не реплицируются в *B. japonicum*, необходимо создать векторы, совместимые с pRK290 и используемые в этих бактериях.

IV.B. ВЕКТОРЫ-САМОУБИЙЦЫ

Векторы, не способные реплицироваться в реципиенте, имеют два основных назначения: доставка транспозонов и замещение генов. Исходные процедуры для проведения этих опытов у *Rhizobium* и *Agrobacterium* были эффективными, но не воспроизводимыми. Первые схемы транспозонов мутагенеза с использованием плазмид широкого спектра хозяев (RP4 или pRHII) содержали встройки бактериофага Mu, который дестабилизировал эти плазмиды (Boucher et al., 1977; Van Vliet et al., 1978). Использование этих конструкций для транспозонов мутагенеза позволило получить ряд важных мутантов (Berlinger et al., 1978b; Hernalsteens et al., 1978; Meade et al., 1982). Однако имелся ряд проблем, связанных с использованием Mu (делеции, независимая транспозиция Mu), которые вносили дополнительную сложность в эксперименты.

Первые опыты по замещению маркеров у *Rhizobium* были проведены с использованием несовместимых плазмид R751 и pRHII для отбора рекомбинантов, в которых гены, клонированные в векторе с широким спектром хозяев (pRK290), замещали эквивалентный локус в геноме *S. meliloti* (Ruvkun, Ausubel, 1981; Hirsch, Berlinger, 1984). Это обеспечило селекцию рекомбинантов, у которых ген, клонированный в векторе с широким кругом хозяев (pRK290), замещал эквивалентные локусы в геноме *S. meliloti*. Эта методика оказалась достаточно эффективной, однако требовала дополнительной работы по идентификации рекомбинантов.

Решение проблемы доставки транспозона и удобного использования векторов-самоубийц привело к созданию плазмид с узким спектром хозяев, таких как pBR322 и pACYC184 и к адаптации их для использования в ризобиях путем придания функций, обеспечивших мобилизуемость RP4. Это привело к созданию системы векторов, широко используемых в грам-отрицательных бактериях (Simon et al., 1983, 1986). Они эффективно используются для доставки транспозонов и могут быть применены для одноступенчатого замещения генов. Данные векторы мобилизуются с высокими частотами в *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* и в другие бактерии, но не реплицируются в этих хозяевах. Одной из проблем их использования является интеграция в геном реципиента, которая наиболее сильно проявилась при работе с *Azorhizobium caulinodans* в форме “векторного мутагенеза” (Donald et al., 1985). Дальнейшее улучшение этого вектора было связано с введением дополнительной условно-летальной аллели *sacB*, которая обеспечила отбор двойных кроссоверов, то есть замещение генов (Quandt, Hynes, 1993). Ана-

логичные векторы доставки для транспозонов мутагенеза включали мобилизующую плазмиду pRK2013, содержащую производные Tn5 (Finan et al., 1985), и плазмиды, состоящие из *tra*-генов ориджина репликации p15A узкого спектра хозяев IncN и транспозонов Tn5, Tn1 или Tn9 (Selvaraj, Iyer, 1983).

IV.C. ТРАНСПОЗОНЫ

Транспозоновый мутагенез сыграл ключевую роль в развитии генетики Rhizobiaceae. Поскольку большинство изучаемых признаков связано с симбиозом и не проявляется в чистых культурах бактерий (например, образование клубеньков), было важно получать стабильные неревертирующие мутации, за которыми можно легко следить в генетических опытах. Решение этой задачи и обеспечил транспозоновый мутагенез. Были использованы транспозоны Tn5 (Beringer, 1978b; Meade et al., 1982), Tn7 (Hernalsteens et al., 1978), Tn1 (Casadesus et al., 1980), Tn904 (Klapwijk et al., 1980), Tn1831 (Pees et al., 1986), Tn10 (Hynes et al., 1986). Каждый из этих транспозонов имеет свои недостатки, связанные с неслучайностью встройки, возникновением делеций, нестабильностью маркера антибиотикоустойчивости. Наиболее широко используется Tn5. Он встраивается более или менее случайно в геномы различных хозяев и обеспечивает возникновение неревертирующих мутаций. Маркеры устойчивости к стрептомицину, неомицину и блеомицину, кодируемые Tn5, широко используются для Rhizobiaceae, причем были сконструированы новые производные, содержащие маркеры устойчивости к гентамицину, спектиномицину и тетрациклину (Simon et al., 1983; De Vos et al., 1986; Hirsch et al., 1986).

Полезной модификацией Tn5 является Tn5-Mob, описанные выше производные, содержащие ген *sacB* (Simon, 1984; Hynes et al., 1989), производные для создания транскрипционных слияний (содержащие *lacZ*, гены люциферазы и беспромоторный ген устойчивости к неомицину), а также транспозируемые промоторы (Simon et al., 1989). Tn5*phoA* и производные Tn5, обеспечивающие трансляционные слияния с геном щелочной фосфатазы *E. coli* (Manoil, Beckwith, 1985), давали хороший эффект при использовании в *Rhizobium* (Long et al., 1988; Yarosh et al., 1989). Необходимо отметить и производный Tn3 – Tn3HoHo1 (Stachel et al., 1985) который широко использовали для получения *lacZ* слияний у *Agrobacterium* и *Rhizobium*.

IV.D. ПРОБЛЕМЫ БУДУЩЕГО

Генетические системы для анализа ризобий и агробактерий хорошо разработаны. Они обеспечили прогресс в развитии генетического анализа многих бактерий. Одним из отсутствующих элементов являются трансдуцирующие фаги *Bradyrhizobium* и *Agrobacterium* spp. Трансдуцирующие фаги не являются абсолютно необходимыми, если могут быть использованы методики клонирования мутаций и их введения в исходный или в другие штаммы путем замещения маркеров. В то же время, методики трансдукции обеспечивают более быстрое, простое и дешевое решение этой задачи. Необходимы также дополнительные селективные маркеры, которые, при использовании сложных конструкций (содержащих маркеры устойчивости к неомицину, гентамицину и тетрациклину) быстро исчерпывают свои возможности.

В настоящее время близится к завершению определение нуклеотидных последовательностей более чем 30 микробных геномов. Мы вступаем в эпоху, когда полное секвенирование микробного генома становится обычным делом. Можно надеяться, что полное секвенирование генома некоторых видов Rhizobiaceae будет завершено в ближайшее время. Уже созданы полные последовательности плазмиды pSym штамма NGR234 *Rhizobium* sp. (более 500 т.п.н.), обладающего широким спектром хозяев (Freiberg et al., 1996, 1997). Анализ этой последовательности позволил выявить ряд интересных свойств плазмиды и породил важные гипотезы об эволюции данного штамма и о дополнительных генах, вовлеченных в симбиоз. По мере включения последовательностей плазмид и целых геномов ризобий в базы данных, будет возрастать полезность этих данных для выявления функций потенциальных рамок считывания.

Очевидно, что геномы ризобий содержат гены “домашнего хозяйства”, транскрипции, трансляции, репликации, синтеза клеточной стенки, которые являются общими для всех бактерий. Остается возможность выявления новых генов, участвующих в фиксации азота и формировании клубеньков. Важно выяснить также, могут ли подобные генные кластеры быть обнаружены у почвенных бактерий. Генетические исследования пока вносят относительно небольшой вклад в изучение конкуренции и выживания штаммов в почве. Будет интересно выяснить, могут ли работы по секвенированию генома внести вклад в эту слабо разработанную область знания.

V. Литература

- Albright L., Ronson C., Nixon T., Ausubel F. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 1832-1941.
- Allardet-Servent A., Michaux-Charachon S., Jumas-Bilak E., Karayan L., Ramuz M. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 7869-7874.
- Bae Y.M., Holmgren E., Crawford I.P. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 3471-3478.
- Bae Y.M., Stauffer G.V. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 5831-5836.
- Balassa R. (1954) *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* V. 2, p. 51-78.
- Balassa R. (1957) *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* V. 4, p. 77-84.
- Baldani J.L., Weaver R.W., Hynes M.F., Eardly B.D. (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 58, p. 2308-2314.
- Banfalvi Z., Sakanyan V., Koncz C., Kiss A., Dusha I., Kondorosi A. (1981) *Mol. Gen. Genet.* V. 184, p. 318-325.
- Banfalvi Z., Kondorosi E., Kondorosi A. (1985) *Plasmid.* V. 13, p. 129-138.
- Bardin S., Dan S., Osteras M., Finan T.M. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 4540-4547.
- Barnett M.J., Rushing B.G., Fisher R.F., Long S.R. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 1782-1787.
- Beringer J.E. (1974) *J. Gen. Microbiol.* V. 84, p. 188-198.
- Beringer J.E. (1980) *J. Gen. Microbiol.* V. 116, p. 1-7.
- Beringer J.E., Beynon J.L., Buchanan-Wollaston A.V., Johnston A.W.B. (1978b). *Nature.* V. 276, p. 633-634.
- Beringer J.E., Hoggan S.A., Johnston A.W.B. (1978a) *J. Gen. Microbiol.* V. 104, p. 201-207.
- Beringer J.E., Hopwood D.A. (1976) *Nature.* V. 264, p. 291-293.
- Better M., Helinski D.R. (1983) *J. Bacteriol.* V. 155, p. 311-316.
- Beynon J.L., Beringer J.E., Johnston A.W.B. (1980) *J. Gen. Microbiol.* V. 120, p. 421-429.
- Boivin C., Camut S., Malpica C., Truchet G., Rosenberg C. (1990) *The Plant Cell.* V. 2, p. 1157-1170.
- Bonnard G., Vincent F., Offen L. (1989) *Plasmid.* V. 22, p. 70-81.
- Boucher C., Bergeron B., Barate de Bertalmio M., Denarie J. (1977) *J. Gen. Microbiol.* V. 98, p. 253-263.
- Brewin N., De Jong T., Phillips D., Johnston A. (1980) *Nature.* V. 288, p. 77-79.
- Brom S., Garcia de los Santos A., Stepkowski T., Flores M., Davila G., Romero D., Palacios R. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 5183-5189.
- Buchanan-Wollaston V. (1979) *J. Gen. Microbiol.* V. 112, p. 135-142.
- Burkardt B., Schillik D., Puhler A. (1987) *Plasmid.* V. 17, p. 13-25.
- Casadesus J., Ianez E., Olivares J. (1980) *Mol. Gen. Genet.* V. 180, p. 405-410.
- Casadesus J., Olivares J. (1979) *Mol. Gen. Genet.* V. 174, p. 59-66.
- Casadesus J., Olivares J. (1979) *J. Bacteriol.* V. 139, p. 316-317.
- Casse F., Boucher C., Julliot J.S., Michel M., Denarie J. (1979) *J. Gen. Microbiol.* V. 113, p. 229-242.
- Charles T.C., Doty S.L., Nester E. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 60, p. 4192-4194.
- Charles T.C., Finan T.M. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 2469-2476.
- Charles T.C., Finan T.M. (1991) *Genetics.* V. 127, p. 5-20.
- Costantino P., Hooykaas P.J.J., den Dulk-Ras H., Schilperoort R.A. (1980) *Gene.* V. 11, p. 79-87.
- Courtois J., Courtois B., Guillaume J. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 5925-5927.
- De Maagd R., Mulders I., Canter Cremers H., Lugtenberg B. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 214-222.
- De Meirsmen C., van Soom C., Verreth C., Van Gool A., Vanderleyden J. (1990) *Plasmid.* V. 24, p. 227-234.
- De Vos G.F., Walker G.C., Signer E.R. (1986) *Mol. Gen. Genet.* V. 204, p. 485-491.
- Deng W., Gordon M.P., Nester E.W. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 2554-2559.
- Depicker A., De Wilde M., De Vos G., De Vos R., Van Montagu M., Schell J. (1980) *Plasmid.* V. 3, p. 193-211.
- Ditta G., Schmidhauser T., Yakobson E., Lu P., Liang X.W., Finlay D.R., Guiney D., Helinski D.R. (1985) *Plasmid.* V. 13, p. 149-153.
- Ditta G., Stanfield S., Corbin D., Helinski S.R. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 77, p. 7347-7351.
- Donald R.G., Raymond C.K., Ludwig R.A. (1985) *J. Bacteriol.* V. 162, p. 317-323.
- Dorgai L., Papp I., Papp P., Kalman M., Orosz L. (1993) *Nucl. Acid. Res.* V. 21, p. 1671.
- Drozanska D., Lorkiewicz Z. (1978) *Acta Microbiol. Pol.* V. 27, p. 81-88.
- Dusha I., Kovalenko S., Banfalvi Z., Kondorosi A. (1987) *Mol. Gen. Genet.* V. 169, p. 1403-1409.
- Eckhardt T. (1978) *Plasmid.* V. 1, p. 584-588.
- Faas L.A. (1995) Thesis, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada.

- Farrand S.K., O'Morchoe S.P., McCutchan J. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 5314-5321.
- Figurski D.H., Helinski D.R. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 76, p. 1648-1652.
- Finan T.M., Hartwig E., LeMieux K., Bergman K., Walker G.C., Signer E.R. (1984) *J. Bacteriol.* V. 159, p. 120-124.
- Finan T.M., Hirsch A., Leigh J., Johansen E., Kuldau G., Deegan S., Walker G., Signer E. (1985) *Cell.* V. 40, p. 869-877.
- Finan T.M., Kunkel B., De Vos G.F., Signer E.R. (1986) *J. Bacteriol.* V. 167, p. 66-72.
- Finan T.M., Oresnik I., Bottacin A. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 3396-3403.
- Fisher R.F., Brierley H.L., Mulligan J.T., Long S.R. (1987) *J. Biol. Chem.* V. 262, p. 6849-6855.
- Flores M., Gonzalez V., Brøn S., Martinez E., Pinero D., Romero D., Davila G., Palacios R. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 5782-5788.
- Fournier P., Paulus F., Often L. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 3151-3160.
- Freiberg C., Fellay R., Bairoch A., Broughton W.J., Rosenthal A., Perret X. (1997) *Nature.* V. 387, p. 394-401.
- Frieberg C., Perret X., Broughton W., Rosenthal A. (1996) *Genome Research.* V. 6, p. 590-600.
- Friedman A.M., Long S.R., Brown S.E., Buikema W.J., Ausubel F.M. (1982) *Gene.* V. 18, p. 289-296.
- Gajendiran N., Mahadevan A. (1990) *FEMS Microbiol. Ecol.* V. 73, p. 125-130.
- Gallie D.R., Hagiya M., Kado C.I. (1985a) *J. Bacteriol.* V. 161, p. 1034-1041.
- Gallie D.R., Kado C.I. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 3170-3176.
- Gallie D.R., Novak S., Kado C.I. (1985b) *Plasmid.* V. 14, p. 171-175.
- Gallie D.R., Zaitlin D., Perry K.L., Kado C.L. (1984) *J. Bacteriol.* V. 157, p. 739-745.
- Garcia de los Santos A., Brøn S., Romero D. (1996) *World J. Microbiol. Biotech.* V. 12, p. 119-125.
- Gay P., Le Coq D., Steinmetz M., Berkelman T., Kado C.I. (1985) *J. Bacteriol.* V. 164, p. 918-921.
- Gerard J.C., Canaday J., Szegedi E., de la Salle H., Often L. (1992) *Plasmid.* V. 28, p. 146-156.
- Girard M., Flores M., Brøn S., Romero D., Palacios R., Davila G. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 2411-2419.
- Glazebrook J., Meiri G., Walker G.C. (1992) *Molec. Plant. Microbe. Interac.* V. 5, p. 223-227.
- Goldman A., Lecoeur L., Message B., Delarue M., Schöonejans E., Tepfer D. (1994) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 115, p. 305-312.
- Gray K.M., Pearson J.P., Downie J.A., Boboye B.E., Greenberg E.P. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 372-376.
- Gribskov M., Devereux J., Burgess R. (1984) *Nucl. Acids Res.* V. 12, p. 539-549.
- Gross D.C., Vidaver A.K., Klucas R.V. (1979) *J. Gen. Microbiol.* V. 114, p. 257-266.
- Haas D., Holloway B. (1976) *Mol. Gen. Genet.* V. 144, p. 243-251.
- Hattermann D., Stacey G. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 56, p. 833-836.
- Hermesz E., Olasz F., Dorgai L., Orosz L. (1992) *Gene.* V. 119, p. 9-15.
- Hernalsteens J.P., de Greve H., Van Montagu M., Schell J. (1978) *Plasmid.* V. 1, p. 218-225.
- Heumann W. (1968) *Mol. Gen. Genet.* V. 102, p. 132-144.
- Higashi S. (1967) *J. Gen. Appl. Microbiol.* V. 13, p. 391-403.
- Hirsch P.R. (1979) *J. Gen. Microbiol.* V. 113, p. 219-228.
- Hirsch P.R., Beringer J.E. (1984) *Plasmid.* V. 12, p. 139-141.
- Hirsch P.R., Van Montagu M., Johnston A.W.B., Brewin N.J., Schell J. (1980) *J. Gen. Microbiol.* V. 120, p. 403-412.
- Hirsch P.R., Wang C.L., Woodward M.J. (1986) *Gene.* V. 48, p. 203-209.
- Holsters M., Silva B., Van Vliet F., Genetello C., De Block M., Dhaese P., Depicker A., Inze D., Engler G., Villaroel R., Van Montagu M., Schell J. (1980) *Plasmid.* V. 3, p. 212-230.
- Horn S., Uratsu S., Hong F. (1984) *J. Bacteriol.* V. 159, p. 335-340.
- Hombrecher G., Brewin N.J., Johnston A.W.B. (1981) *Mol. Gen. Genet.* V. 182, p. 133-136.
- Honeycutt R.J., McClelland M., Sobral B.W.S. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 6945-6952.
- Hooykaas P.J.J., Kalpwijk P.M., Nuti M.P., Schilperoort R.A., Rorsch A. (1977) *J. Gen. Microbiol.* V. 98, p. 477-484.
- Hooykaas P.J.J., Peerbolte R., Regensburg-Tuinik A.J.G., De Vries P., Schilperoort R.A. (1982) *Mol. Gen. Genet.* V. 188, p. 12-17.
- Hooykaas P.J.J., Van Brussel A.A.N., den Dulk-Ras H., van Slogteren G.M.S., Schilperoort R.A. (1981) *Nature.* V. 291, p. 351-353.
- Hynes M.F., Simon R., Puhler A. (1985) *Plasmid.* V. 13, p. 99-105.
- Hynes M.F., Simon R., Muller P., Niehaus K., Labes M., Puhler A. (1986) *Mol. Gen. Genet.* V. 202, p. 356-362.
- Hynes M.F., Brucksch K., Priefer U. (1988) *Arch. Microbiol.* V. 150, p. 326-332.
- Hynes M.F., Quandt J., O'Connell M.P., Puhler A. (1989) *Gene.* V. 78, p. 111-120.
- Hynes M.F., McGregor N.F. (1990) *Molec. Microbiol.* V. 4, p. 567-571.
- Jones J.D.G., Gutterston N. (1987) *Gene.* V. 61, p. 299-306.
- Jouanin L., Tourneur J., Tourneur C., Casse-Delbart F. (1986) *Plasmid.* V. 16, p. 124-134.
- Jordan D.C. (1984) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Eds. Williams and Williams Pub Baltimore/London. V. 1, p. 234-256.
- Kado C.L., Liu S.T. (1981) *J. Bacteriol.* V. 145, p. 1365-1373.
- Kaluza K., Hahn M., Hennecke H. (1985) *J. Bacteriol.* V. 162, p. 535-542.
- Kiss G.B., Kalman Z. (1982) *J. Bacteriol.* V. 150, p. 465-470.
- Klapwijk P.M., van Beelen P., Schilperoort R.A. (1979) *Mol. Gen. Genet.* V. 173, p. 171-175.
- Klapwijk P.M., Van Breukelen J., Korevaar K., Ooms G., Schilperoort R.A. (1980) *J. Bacteriol.* V. 141, p. 129-136.
- Klein S., Lohman K., Clover R., Walker G., Signer E. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 324-326.

- Kondorosi A., Kiss G.B., Forrai T., Vincze E., Banfalvi Z. (1977) *Nature*. V. 268, p. 525-527.
- Kondorosi A., Kondorosi E., Pankhurst C.E., Broughton W.J., Banfalvi Z. (1982) *Mol. Gen. Genet.* V. 188, p. 433-439.
- Kondorosi A., Vincze E., Johnston A.W.B., Beringer J.E. (1980) *Mol. Gen. Genet.* V. 178, p. 403-408.
- Kowalski M. (1967) *Acta Microbiol. Polon.* V. 16, p. 7-12.
- Krawiec S., Riley M. (1990) *Microbiol. Rev.* V. 54, p. 502-539.
- Krishnan H.B., Pueppke S.G. (1991) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 4, p. 521-529.
- Krishnan H.B., Pueppke S.G. (1993) *Appl. Environ. Microb.* V. 59, p. 150-155.
- Kundig C., Beck C., Hennecke H., Gottfert M. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 5151-5154.
- Kundig C., Hennecke H., Gottfert M. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 613-622.
- Kuykendall L.D. (1979) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 37, p. 862-866.
- Laberge S., Middleton A.T., Wheatcroft R. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 3133-3142.
- Labes M., Puhler A., Simon R. (1990) *Gene*. V. 89, p. 37-46.
- Lamb J.W., Hombrecher G., Johnston A.W.B. (1982) *Mol. Gen. Genet.* V. 186, p. 449-452.
- LeBon J.M., Kado C.L., Rosenthal L.J., Chirikjian J.G. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 75, p. 4097-4101.
- Ledeboer A.M., Krol A.J.M., Dons J.J.M., Spier F., Schilperoort R.A., Zaenen I., Van Larebeke N., Schell J. (1976) *Nucl. Acid Res.* V. 3, p. 449-463.
- Leong S.A., Williams P.H., Ditta G.S. (1985) *Nucl. Acids Res.* V. 13, p. 5965-5976.
- Lin B.C., Kado C.I. (1977) *Can. J. Microbiol.* V. 23, p. 1554-1561.
- Long S.R., Buikema W.J., Ausubel F.M. (1982) *Nature*. V. 298, p. 485-488.
- Long S.R., McCune S., Walker G.C. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 4257-4265.
- Luka S., Patriarca E.J., Riccio A., Iaccarino M., Defez R. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 7138-7143.
- Luyindula H., Tshitenge G., Lurquin P., Ledoux L. (1975) *Arch. Int. Physiol. Biochim.* V. 83, p. 199-200.
- Machida Y., Sakurai M., Kiyokawa S., Ubasawa A., Suzuki Y., Ikeda J.E. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 81, p. 7495-7499.
- Malakooti J., Ely B. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 6854-6860.
- Malakooti J., Wang S.P., Ely B. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 4372-4376.
- Manoil C., Beckwith J. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 82, p. 8129-8133.
- Margolin W., Long S.R. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 6553-6561.
- Martin M.O., Long S.R. (1984) *J. Bacteriol.* V. 159, p. 125-129.
- Martinez-Salazar J.M., Romero D., Girard M.L., Davila G. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 3035-3040.
- Mazurier S.I., Rigottier-Gois L., Amarger N. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 62, p. 685-693.
- Meade H.M., Long S.R., Ruvkun G.B., Brown S.E., Ausubel F.M. (1982) *J. Bacteriol.* V. 149, p. 114-122.
- Meade H.M., Signer E.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 74, p. 2076-2078.
- Megias M., Caviedes M., Palomares A., Perez-Silva J. (1982) *J. Bacteriol.* V. 149, p. 59-64.
- Mercado-Blanco J., Garcia F., Fernandez-Lopez M., Olivares J. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 5403-5410.
- Mercado-Blanco J., Olivares J. (1994a) *Gene*. V. 139, p. 133-134.
- Mercado-Blanco J., Olivares J. (1994b) *Plasmid*. V. 32, p. 75-797.
- Mercado-Blanco J., Toro N. (1996) *Mol. Genet. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 535-545.
- Merlo D.J., Nester E.W. (1977) *J. Bacteriol.* V. 129, p. 76-80.
- Michiels J., Vandebroek A., Vanderleyden J. (1991) *Mol. Gen. Genet.* V. 228, p. 486-490.
- Mitsch M.J. (1995) Thesis, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada.
- Mizuno H., Suzuki T., Akagawa M., Yamasato K., Yamada Y. (1990) *Agric. Biol. Chem.* V. 54, 1797-1802.
- Moenne-Loccoz Y., Baldani J.I., Weaver R.W. (1995) *Letters Appl. Microbiol.* V. 20, p. 175-179.
- Moenne-Loccoz Y., Sen D., Krause E.S., Weaver R.W. (1994) *Agron. J.* V. 86, p. 117-121.
- Moenne-Loccoz Y., Weaver R.W. (1995a) *Soil Biol. Biochem.* V. 27, p. 1001-1004.
- Moenne-Loccoz Y., Weaver R.W. (1995b) *FEMS Microbiol. Ecol.* V. 8, p. 139-144.
- Moenne-Loccoz Y., Weaver R.W. (1996) *Appl. Soil Ecol.* V. 3, p. 137-148.
- Mozo T., Cabrera E., Ruiz-Argueso T. (1990) *Plasmid*. V. 23, p. 201-215.
- O'Brien J.K., Ryan A.J., O'Connell M. (1993) Accession LI 9650, Unpublished.
- O'Connell M.P., Hynes M.F., Puhler A. (1987) *Plasmid*. V. 18, p. 156-163.
- O'Gara F., Dunican L. (1973) *J. Bacteriol.* V. 116, p. 1177-1180.
- Oresnik I., Charles T., Finan T. (1994) *Genetics*. V. 136, p. 1233-1243.
- Osteras M., Stanley J., Broughton W. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 5485-5494.
- Osteras M., Stanley J., Broughton W., Dowling D. (1989) *Mol. Gen. Genet.* V. 220, p. 157-160.
- Paulus F., Canaday J., Vincent F., Bonnard G., Kares C., Otten L. (1991) *Plant Mol. Biol.* V. 16, p. 601-614.
- Paulus F., Huss B., Tinland B., Hermann A., Canaday J., Otten L. (1991) Accession M63056 J03693, Unpublished.
- Pees E., Wijffelman C., Mulders I., van Brussel A.A.N., Lugtenberg B.J.J. (1986) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 33, p. 165-171.
- Perret X., Broughton W.J., Brenner S. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 88, p. 1923-1927.
- Pomponi M., Spano L., Sabbadini M.G., Costantino P. (1983) *Plasmid*. V. 10, p. 119-129.
- Ponsonnet C., Normand P., Pilate G., Nesme X. (1995) *Microbiology*. V. 141, p. 853-861.
- Prakash R.K., Schilperoort R.A., Nuti M.P. (1981) *J. Bacteriol.* V. 145, p. 1129-1136.
- Prakash R.K., Van Brussel A.A.N., Quint A., Mennes A.M., Schilperoort R.A. (1982b) *Plasmid*. V. 7, p. 281-286.
- Prakash R.K., van Veen R.J.M., Schilperoort R.A. (1982a) *Plasmid*. V. 7, p. 271-280.

- Priefer U.B., Kalinowski J., Ruger B., Heumann W., Puhler A. (1989) *Plasmid*. V. 2, p. 120-128.
- Priefer U.B., Simon R., Puhler A. (1985) *J. Bacteriol.* V. 163, p. 324-330.
- Quandt J., Hynes M.F. (1993) *Gene*. V. 127, p. 15-21.
- Raina J.L., Modi V.V. (1971) *J. Gen. Microbiol.* V. 65, p. 161-165.
- Ramseier T.M., Gottfert M. (1991) *Arch. Microbiol.* V. 156, p. 270-276.
- Riera J., Fernandez de Henestrosa A.R., Garriga X., Tapias A., Barbe J. (1994) *Mol. Gen. Genet.* V. 245, p. 523-527.
- Rochepeau P., Selinger L.B., Hynes M.F. (1997) *Mol. Gen. Genet.* V. 256, p. 387-396.
- Roest H., Bloemendaal C., Wijffelman C., Lugtenberg B. (1992) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 4985-4991.
- Romero D., Davila G., Palacios R. (1997) In: De Bruijn F., J. Lupski, Weinstock G. (eds.) *Chapman and Hall. USA* (in press).
- Romero D., Martinez-Salazar J., Girard L., Brom S., Davilla G., Palacios R., Flores M., Rodriguez C. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 973-980.
- Rosenberg C., Boistard P., Denarie J., Casse-Delbart F. (1981) *Mol. Gen. Genet.* V. 184, p. 326-333.
- Rosenberg C., Casse-Delbart F., Dusha I., David M., Boucher C. (1982) *J. Bacteriol.* V. 150, p. 402-406.
- Rosenberg C., Huguet T. (1984) *Mol. Gen. Genet.* V. 196, p. 533-536.
- Rushing B.G., Long S.R. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 6952-6957.
- Ruvkun G.B., Ausubel F.M. (1981) *Nature*. V. 289, p. 85-88.
- Ruvkun G.B., Long S.R., Meade H.M., Van den Bos R.C., Ausubel F.M. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* V. 1, p. 405-418.
- Saint C., Wexler M., Murphy P., Tempe J., Tate M., Murphy P. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 5205-5215.
- Sanderson K.E. (1976) *Ann. Rev. Microbiol.* V. 30, p. 327-349.
- Schripsema J.K., Rudder E.E., van Vliet T.B., Lankhorst P.P., de Vroom E., van Brussel A.A.N. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 366-371.
- Schwinghamer E.A. (1980) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 7, p. 157-162.
- Segal G., Ron E. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 3026-3030.
- Selbitschka W., Arnold W., Jording D., Kosier B., Toro N., Puhler A. (1995) *Gene*. V. 163, p. 59-64.
- Selbitschka W., Arnold W., Priefer U.B., Rottschäfer T., Schmidt M., Simon R., Puhler A. (1991) *Mol. Gen. Genet.* V. 229, p. 86-95.
- Selvaraj G., Iyer V.N. (1981) *Gene*. V. 15, p. 279-283.
- Selvaraj G., Iyer V.N. (1983) *J. Bacteriol.* V. 156, p. 1292-1230.
- Shen W., Forde B. (1989) *Nucl. Acids Res.* V. 17, p. 8385.
- Sik T., Horvath J., Chatterjee S. (1980) *Mol. Gen. Genet.* V. 178, p. 511-516.
- Simon R. (1984) *Mol. Gen. Genet.* V. 196, p. 413-420.
- Simon R., Hotte B., Klauke B., Kosier B. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 1502-1508.
- Simon R., O'Connell M., Labes M., Puhler A. (1986) *Meth. Enzym.* V. 118, p. 640-659.
- Simon R., Priefer U., Puhler A. (1983) *Biotechnology*. V. 1, p. 784-791.
- Simon R., Quandt J., Klipp W. (1989) *Gene*. V. 80, p. 161-169.
- Sobral B.W.S., Honeycutt R.J., Atherly A.G. (1991a) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 704-709.
- Sobral B.W.S., Honeycutt R.J., Atherly A.G., McClelland M. (1991b) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 5173-5180.
- Soto M.J., Zorzano A., Garcia-Rodriguez P.M., Mercado-Blanco J., Lopez-Lara I.M., Olivares J., Toro N. (1994) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 703-707.
- Soto M.J., Zorzano A., Olivares J., Toro N. (1992) *Gene*. V. 120, p. 125-126.
- Soto M.J., Zorzano A., Olivares J., Toro N. (1992) *Plant Mol. Biol.* V. 20, p. 307-309.
- Spaink H.P., Okker R., Wijffelman C., Pees E., Lugtenberg B. (1987) *Plant Mol. Biol.* V. 9, p. 27-39.
- Stachel S., An G., Flores C., Nester E.W. (1985) *EMBO J.* V. 4, p. 891-898.
- Staskawicz B., Dahlbeck D., Keen N., Napoli C. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 5789-5794.
- Sullivan J.T., Patrick H.N., Lowther W.L., Scott D.B., Ronson C.W. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 92, p. 8985-8989.
- Svab Z., Kondorosi A., Orosz L. (1978) *J. Gen. Microbiol.* V. 106, p. 321-327.
- Swinton D., Hattman S., Benzinger R., Buchanan-Wollaston V., Beringer J. (1985) *FEBS Lett.* V. 184, p. 294-298.
- Tabata S., Hooykaas P.J.J., Oka A. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 1665-1672.
- Tepper D., Goldmann A., Pamboukdjian N., Maille M., Lepingle A., Chevalier D., Denarie J., Rosenberg C. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 1153-1161.
- Toro N., Olivares J. (1986) *Mol. Gen. Genet.* V. 202, p. 331-335.
- Turner S.L., Rigottier-Gois L., Power R.S., Amarger N., Young J.P.W. (1996) *Microbiology*. V. 142, p. 1705-1713.
- Turner S.L., Young J.P.W. (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 133, p. 53-58.
- Ulrich A., Puhler A. (1994) *Mol. Gen. Genet.* V. 242, p. 505-516.
- Vanderleyden J., Desair J., De Meirman C. (1991) *DNA Seq.* V. 2, p. 163-172.
- Van Larebeke N., Engler G., Holsters M., Van den Elsacker S., Zaenen I., Schilperoort R.A., Schell J. (1974) *Nature*. V. 242, p. 171-172.
- Van Veen R., den Dulk-Ras H., Bisseling T., Schilperoort R., Hooykaas P. (1988) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 1, p. 231-234.
- Van Vliet F., Silva B., Van Montagu M., Schell J. (1978) *Plasmid*. V. 1, p. 446-455.
- Vesely Z., Muller A., Scmitz G.G., Kaluza K., Jarsch M., Kessler C. (1990) *Gene*. V. 95, p. 129-131.

- Vilaine F., Casse-Delbart F. (1987) *Gene*. V. 55, p. 105-114.
- Vinardell J.M., Ollero F.J., Ruiz-Sainz J.E. (1996) Accession Y08939, Unpublished.
- Wabiko H. (1992) *Gene*. V. 114, p. 229-233.
- Watson R.J., Chan Y.-K., Wheatcroft R., Yang A.-F., Han S. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 927-934.
- Watson R.J., Wheatcroft R. (1991) Accession X56562, Unpublished.
- Watson R.J., Wheatcroft R. (1991) *DNA Seq.* V. 2, p. 163-172.
- Wheatcroft R., Laberge S. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 2530-2538.
- Wheatcroft R., Watson R.J. (1988) *J. Gen. Microbiol.* V. 134, p. 113-121.
- White F.F., Nester E.W. (1980) *J. Bacteriol.* V. 141, p. 1134-1141.
- White F.F., Nester E.W. (1980) *J. Bacteriol.* V. 144, p. 710-720.
- Wijffelman C.A., Pees E., Van Brussel A.A.N., Hooykaas P.J.J. (1983) *Mol. Gen. Genet.* V. 192, p. 171-176.
- Williams M., Klein S., Signer E. (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 55, p. 3229-3230.
- Yakobson E., Guiney D. (1984) *J. Bacteriol.* V. 160, p. 451-453.
- Yarosh O., Charles T., Finan T. (1989) *Mol. Microbiol.* V. 3, p. 813-823.
- Zekri S., Toro N. (1996) Accession X95567, Unpublished.
- Zurkowski W. (1981) *Mol. Gen. Genet.* V. 181, p. 522-524.
- Zurkowski W. (1982) *J. Bacteriol.* V. 150, p. 999-1007.
- Zurkowski W., Lorkiewicz Z. (1978) *Acta Microbiol. Polon.* V. 27, p. 309-319.
- Zurkowski W., Lorkiewicz Z. (1979) *Arch. Microbiol.* V. 123, p. 195-201.

Белки наружной мембраны

Люгтенберг Б.

I. Оболочка клеток грам-отрицательных бактерий.....	63
II. Наружная мембрана бактерий семейства Rhizobiaceae.....	65
II.A. Субклеточные фракции.....	65
II.B. Предварительная характеристика белков.....	65
II.C. Иммунологическая характеристика белков.....	66
II.D. Сравнение свободноживущих бактерий и бактериоидов.....	67
II.E. Доступность белковых антигенов.....	67
II.F. Сравнение различных представителей Rhizobiaceae.....	68
II.G. Олигомеры белков и их взаимодействие с пептидогликаном и фагами.....	68
II.H. Влияние Sym-плазмиды и индукции <i>nod</i> -генов на состав мембранных белков у <i>Rhizobium</i>	68
II.I. Изменения состава белков при развитии бактериоидов.....	69
III. Генетический контроль синтеза белков наружной мембраны.....	70
III.A. <i>ropA</i>	70
III.B. <i>ropA2</i>	70
III.C. <i>ropA</i> и <i>ropA2</i> возможно кодируют порины.....	70
III.D. <i>ropB</i>	70
III.E. Регуляция экспрессии <i>ropA</i> , <i>ropA2</i> и <i>ropB</i>	71
IV. Литература.....	71

I. Оболочка клеток грам-отрицательных бактерий

Оболочка клеток грам-отрицательных бактерий состоит из трех слоев: 1) цитоплазматическая или внутренняя мембрана, 2) слой пептидогликана, 3) наружная мембрана (рис. 1). Цитоплазматическая мембрана состоит из бислоя фосфолипидов и некоторых белков, которые участвуют в транспорте веществ, выработке энергии и синтезе компонентов клеточной оболочки. Пептидогликановый слой образуют блоки, составленные из N-ацетилглюкозамина, N-ацетилмурамовой кислоты и некоторых аминокислот (обычно L-аланин, D-глутаминовая кислота, мезо-диаминопимелиновая кислота и D-аланин). Он определяет форму клетки и препятствует лизису цитоплазматической мембраны в гипотонических условиях. Наружная мембрана *Enterobacteriaceae* защищает содержимое клетки от детергентов, экзогенных ферментов, таких как протеазы, фосфолипазы и гидрофобные антибиотики с большой молекулярной массой. Все это является следствием особой структуры наружной мембраны. В состав ее внутреннего липидного слоя входят фосфолипиды, тогда как наружный слой состоит из жирных кислот липида А, входящего в состав ЛПС (липополисахаридов). Остатки фосфата и отрицательно заряженного КДО (кето-деоксиктоната) внутреннего кора молекулы ЛПС взаимодействуют с двухвалентными катионами, формируя фактически непроницаемый барьер. Поровые белки образуют в наружной мембране жидкостные каналы, сквозь которые проникают гидрофильные молекулы с массой не более 600-700 дальтон (подразумевается, что молекулы имеют более или менее глобулярную структуру). Эти поры способствуют быстрому попаданию в клетку питательных веществ и задерживают крупные гидрофобные молекулы токсинов и антибиотиков (Lugtenberg, van Alphen, 1983).

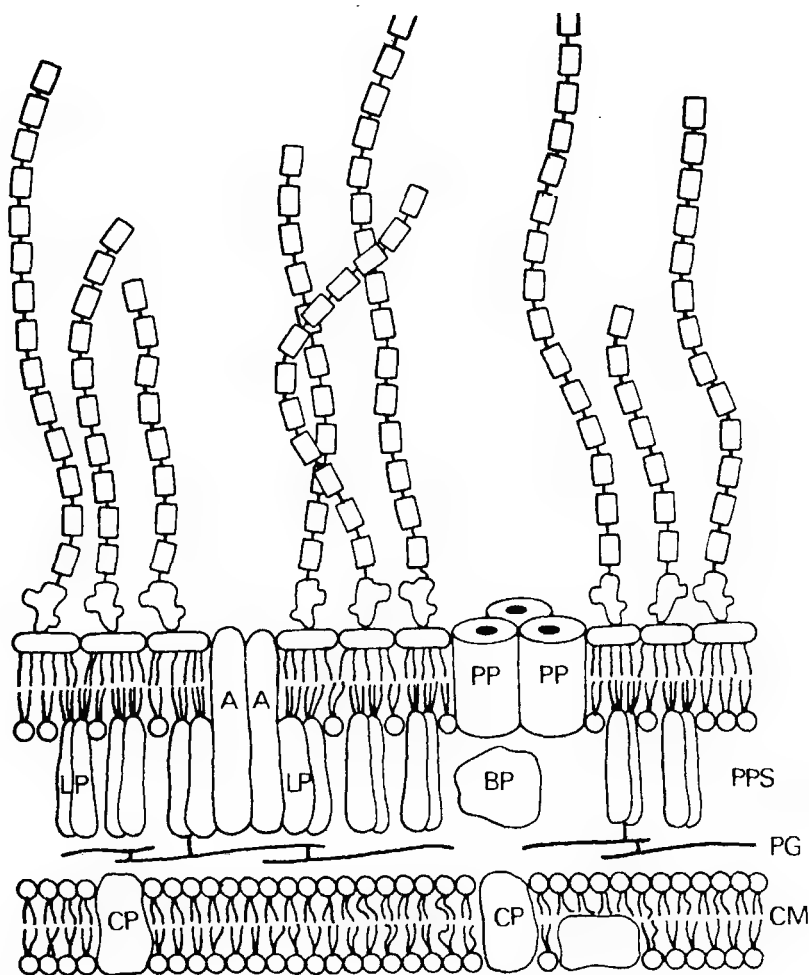


Рисунок 1. Молекулярная структура клеточной оболочки Enterobacteriaceae. CM (цитоплазматическая мембрана) состоит из фосфолипидного бислоя и белков, в том числе и CP (белков-переносчиков), участвующих в транспорте питательных веществ. CM окружена пептидогликанами (PG), молекулы которых состоят из цепей аминокислот, соединенных друг с другом пептидными мостиками. PPS — компартмент между наружной мембраной и CM (периплазматическое пространство). В нем содержатся специфические белки, например, BP (белки прикрепления), вовлеченные в транспорт веществ, и ферменты, такие как алкалин-фосфатаза и β -лактамаза. Наружная мембрана состоит из фосфолипидов, ЛПС (липополисахаридов) и белков. Фосфолипиды расположены исключительно на внутреннем, а ЛПС на наружном слоях липидов. Основными белками наружной мембраны являются PP (поровые белки образуют жидкостные каналы, через которые могут диффундировать вещества): A — белок OmpA, трансмембранная молекула, нековалентно соединяющая наружную мембрану с расположенным ниже PPS; LP (липопротеин Брауна) — заякорен во внутреннем липидном слое тремя жирными кислотами, а белковая часть находится в PPS (Lugtenberg, van Alphen, 1983).

Проницаемость наружной мембраны клеток *Rhizobiaceae* никогда не изучалась. В нескольких публикациях показано, что наружная мембрана бактериоидов отличается от бактериальной мембраны (van Brussel et al., 1977; Planque et al., 1979; Bal, Wong, 1982; Bal et al., 1985). В дополнение к поровым белкам, мембрана *Escherichia coli* содержит и другие белки, например, липопротейн Брауна (часть молекулы которого ковалентно присоединяется к пептидогликану) и белок OmpA. Оба они вносят вклад в жесткость комплекса “наружная мембрана-пептидогликан” (Lugtenberg, van Alphen, 1983).

Бактериофаги используют рецепторы наружной мембраны для прикрепления. В состав рецепторов обычно входит ЛПС или комплексы белков и ЛПС. Опыты *in vitro* с белком OmpA показали, что ЛПС необходимы для придания структуры белкам, обладающим рецепторной активностью по отношению к бактериофагам (van Alphen, 1977).

Флагеллы используются бактериями для движения. Основная часть флагеллы, ее тело, состоит из мономеров белка флагеллина. Флагелла закорена в клеточной оболочке с помощью кольцевых структур, присоединенных ко всем трем входящим в состав оболочки слоям. Фимбрии, используемые для прикрепления, как правило, состоят из белковых мономеров, но у *Rhizobium* (Smit et al., 1987) и *Agrobacterium* (Matthyse et al., 1981) они, по-видимому, состоят из целлюлозы.

II. Наружная мембрана бактерий семейства *Rhizobiaceae*

В середине 1980-х годов были предприняты попытки выделения наружной мембраны бактерий семейства *Rhizobiaceae*. Интерес к этой работе был вызван тем, что: 1) на некоторых стадиях клубенькообразования может происходить взаимодействие поверхности бактериальных клеток с растением-хозяином; 2) *Rhizobium* характеризуется чрезвычайно высокими потребностями в кальции для нормального роста (Humphrey, Vincent, 1962, 1965; Vincent, Humphrey, 1968); 3) фракционирование бактерий позволяет локализовать продукты *nod*-генов внутри клетки и, таким образом, помогает выяснять функции этих белков; 4) прежде чем изучать механизм дифференцировки бактерий в бактериоиды, необходимо предварительно выявить между ними различия на молекулярном уровне.

II.A. СУБКЛЕТОЧНЫЕ ФРАКЦИИ

Фракционирование клеток грам-отрицательных бактерий обычно состоит из следующих этапов: 1) плазмолиз клеток; 2) повышение проницаемости наружной мембраны с помощью ЭДТА, что открывает доступ лизоциму, деградирующему пептидогликановый слой; 3) осмотический шок; 4) механическое разрушение клеток; 5) дифференциальное центрифугирование (Osborn et al., 1972). Так, клетки штамма 248 *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* разделяются на фракции цитозоля, цитоплазматической мембраны, периплазмы и наружной мембраны (De Maagd, Lugtenberg, 1986). Белковые молекулы могут присутствовать в одной из этих фракций (в соотношении 45%, 19%, 16%, 19% соответственно) или выделяться в среду (1%). С помощью SDS-PAGE показано, что в каждой фракции присутствуют уникальные белки. Наружная и цитоплазматическая мембраны имеют плавающую плотность 1.243 и 1.137 г/см³, соответственно. Эти показатели хорошо согласуются с данными по другим грам-отрицательным бактериям. С помощью описанного метода разделения мембран охарактеризованы также штаммы RBL-1 *R. leguminosarum* bv. *viciae* и RBL2020 *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (De Maagd, Lugtenberg, 1986). Он также использовался для локализации белка Rhi (24 кДа) в цитозоле (De Maagd et al., 1988b) и, после небольших изменений, для доказательства присутствия белка VirA в цитоплазматической мембране агробактерий (Melchers et al., 1987).

II.B. ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ

Белок-содержащие фракции инкубировали 10 минут в растворе 2% SDS + 1мМ дитиотреола и анализировали с помощью SDS-PAGE (Lugtenberg et al., 1975). В составе цитоплазматической

Таблица 1. Поверхностные антигены штамма 248 *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*^a

Мг антигена, кДа	Тип узнающих антител	Характеристики
17	Мат-40	Антигенная группа I
19	Поликлональные, Мат-3, Мат-16, Мат-24	ЛПС, содержащий О-антиген
22, 24, 26 ^b	Мат-8	Антигенная группа IIa. Исходный белок кодируется геном <i>ropB</i> (Мг=20.3 кДа). В составе белка имеется сигнальный пептид из 23 а/к. Экспрессия гена негативно регулируется в бактериоидах
28	Поликлональные	Компонент флагелл
34	Поликлональные	Компонент флагелл
36-39 ^b	Мат-37, Мат-20, Мат-38	Низкомолекулярный компонент 4 белковых антигенов III группы. Исходный белок кодируется геном <i>ropA</i> (Мг=31.5 кДа для зрелого белка). Синтезируется с сигнальным пептидом из 22 а/к. Экспрессия гена негативно регулируется в бактериоидах. Входит в состав фаговых рецепторов
40-45 ^b	Мат-37, Мат-20, Мат-38	Высокомолекулярный компонент 4 белковых антигенов группы III. Исходный белок кодируется геном <i>ropA2</i> (Мг=36.0 кДа для зрелого белка). Синтезируется с сигнальным пептидом из 22 а/к. Экспрессия гена негативно регулируется в бактериоидах
48	Слабая реакция с Мат-8	Антигенная группа IIb
74	Поликлональные	Антигенная группа IV
Антигенное пятно (smcar) ^b	Мат-37	Олигомеры белков антигенной группы III

^aМг – молекулярная масса, Мат – моноклональное антитело, а/к – аминокислотные остатки.

^bБольшинство молекул антигенов II и III групп ковалентно присоединено к пептидогликану. При разгонке подобных белков в геле видны небольшие лестницы из 3-4 полос, которые, по-видимому, представляют собой незамещенный мономер белка и мономеры с последовательно растущим числом субъединиц пептидогликана, появляющихся в результате деградации последнего лизоцимом.

мембраны штамма 248 *R. leguminosarum* bv. *viciae* можно выделить до 20 белков с молекулярной массой 14–100 кДа. В наружной мембране доминируют примерно 8 белков с массой 36–45 кДа (De Maagd, Lugtenberg, 1986; табл. 1).

II.C. ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ

При Вестерн блот-гибридизации с использованием поликлональной сыворотки кролика к целым клеткам штамма 248 *R. leguminosarum* bv. *viciae* можно увидеть реакцию с тремя антигенами наружной мембраны бактерий (de Maagd et al., 1989a). Полоса, которая соответствовала продукту с массой 19 кДа, идентифицирована как ЛПС, тогда как продукты с массами 28 и 34 кДа оказались компонентами флагелл. Эти данные соответствуют результатам серологического анализа, который показывает, что ризобии характеризуются реакциями О-(соматического) типа и Н-типа с гомологичной сывороткой (Graham, 1969).

С белками наружной мембраны целых клеток ризобий сыворотка реагирует слабо. Для получения антител к белкам наружной мембраны, пригодных для Вестерн блот-гибридизации, была разработана другая стратегия. После первоначальной инъекции препаратом нативной клеточной оболочки, повторные инъекции делались фракцией пептидогликан/наружная мембрана, частично денатурированной 2% SDS. Поскольку в такой фракции ЛПС и флагеллин отсутствуют, а остальные белки наружной мембраны присутствуют в большом количестве, ожидалось, что при блот-гибридизации сыворотка будет эффективно распознавать белки. И, действительно, полученная этим методом поликлональная сыворотка позволила выявить большое количество антигенов в препаратах клеточной оболочки (de Maagd et al., 1989a). Для изучения возможного иммунологического родства белков наружной мембраны сходным образом были получены и моноклональные антитела (Мат). Из 8 мышинных Мат 3 реагировали с ЛПС, а остальные 5, к удивлению исследователей, узнавали более 1 белка наружной мембраны. Следовательно, белки, связывающиеся с одним и тем же Мат, относятся к одной антигенной группе (табл. 1). Эпитопы, узнаваемые Мат-3, -16, -24, -38 и, возможно, Мат-40, присутствуют в целой клетке, тогда как эпитопы, реагирующие с Мат-8, -20 и -37, либо возникают вследствие денатурации мембраны с помощью SDS, либо они столь глубоко погружены в наружную мембрану, что их невозможно выявить прежде, чем наружная мембрана будет разрушена.

II.D. СРАВНЕНИЕ СВОБОДНОЖИВУЩИХ БАКТЕРИЙ И БАКТЕРОИДОВ

Белковые профили оболочки бактериоида и свободноживущих бактерий различаются очень сильно. Результаты Вестерн-гибридизации показывают, что эти различия отражены и в антигенной структуре наружных мембран. Так, у бактериоида обнаруживается антиген I, тогда как антиген IV и ряд минорных белков хотя и обнаруживаются, но с меньшей интенсивностью, чем в составе бактериальной оболочки. Реакция с антигенами групп II и III также слабее примерно в 10 раз. Не очень понятно, является ли эта остаточная активность реальной или обнаруживается вследствие загрязнения пробы бактериоидов компонентами свободноживущих ризобий (de Maagd et al., 1989a).

Применение анти-ЛПС моноклональных антител также позволило выявить различия между бактериями и бактериоидами. Результаты говорят о том, что в оболочке бактериоидов количество двух типов ЛПС либо снижено, либо они сильно изменены. Более ранние исследования также свидетельствовали о снижении или изменении содержания ЛПС в оболочке бактериоидов (Planque et al., 1979; van Brussel et al., 1977; главы 7 и 22).

II.E. ДОСТУПНОСТЬ БЕЛКОВЫХ АНТИГЕНОВ

Антигены ЛПС, узнаваемые Мат-3, -16 и -24, находятся на поверхности клетки и доступны для иммуноглобулинов. В отличие от них, белковые антигены наружной мембраны, реагирующие с Мат-38 (группа III) и Мат-40 (группа I), в целой клетке недоступаемы. По-видимому, доступ к антигенам можно менять, модифицируя содержание ЛПС и Ca^{2+} в оболочке клетки (de Maagd et al., 1989a).

Для нормального роста клетки *Rhizobium* нуждаются в высоком содержании Ca^{2+} (Vincent, 1962), который накапливается в клеточной стенке (Humphrey, Vincent, 1962; Vincent, Humphrey, 1963). Дефицит кальция приводит к изменению формы клеток (Vincent, 1962), снижает их прочность (Humphrey, Vincent, 1965) и меняет антигенные свойства (Humphrey, Vincent, 1965; Vincent, Humphrey, 1968). Для длительного культивирования штамма 248 на среде с триптоном и дрожжевым экстрактом (Trypton-Yeast, TY) в нее необходимо добавлять 7 мМ хлорида кальция. При росте клеток, перенесенных со среды TY/ Ca^{2+} на среду TY без кальция, происходит уменьшение относительного количества ЛПС параллельно с появлением ЛПС в культуральной среде. В этих условиях клетки начинают реагировать с Мат-38, распознающим белки III группы. Предположение о том, что эти белки защищены О-антигенной частью ЛПС, в дальнейшем подтвердилось опытами с мутантом, полностью лишенным ЛПС с низкой электрофоретической подвижностью. Несмотря

на то, что мутант выращивали на среде ТУ, содержащей кальций, ЛПС продолжали реагировать с Мат-38. Таким образом, О-антигенная часть ЛПС не позволяет антигену-38 связываться с иммуноглобулином. Считается, что именно кальций участвует в поддержании такой структуры клеточной стенки, при которой антиген-38 закрыт О-антигенной частью ЛПС (de Maagd et al., 1989a).

II.F. СРАВНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ RHIZOBIACEAE

Сравнение белкового состава мембран 18 штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *trifolii* и *phaseoli* с 6 штаммами *Sinorhizobium meliloti* и 2 штаммами *Agrobacterium tumefaciens* показало следующее (de Maagd et al., 1988a):

1) Белки наружной мембраны I, II, IV антигенных групп присутствуют у всех 18 штаммов *R. leguminosarum* и незначительно различаются по электрофоретической подвижности. Белки III группы сильно варьируют в зависимости от штамма по разнообразию и подвижности. Никаких характеристик, специфичных для каждого биотипа ризобий, выявлено не было (de Maagd et al., 1988a). Поскольку различий между штаммом 248 дикого типа и его мутантом, лишенным Sym-плазмиды, по белковому профилю наружной мембраны обнаружить не удалось (de Maagd et al., 1988b), был сделан вывод о том, что антигенная штаммоспецифичность не контролируется генами Sym-плазмиды.

2) У *S. meliloti* и *A. tumefaciens* присутствуют эпитопы белковых антигенов I и IV групп, а II группа отсутствует. Профили белков, предположительно отнесенных к III группе, отличаются от таковых у *R. leguminosarum*. Реакция Мат 37 с антигенами *S. meliloti* была слабой, тогда как в случае *A. tumefaciens* обнаружена сильная перекрестная реакция. Эти результаты подтверждают ранее установленные различия между *R. leguminosarum* и *S. meliloti*, а также между *Rhizobium* и *Agrobacterium* (de Maagd et al., 1988a).

II.G. ОЛИГОМЕРЫ БЕЛКОВ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ПЕПТИДОГЛИКАНОМ И ФАГАМИ

В отличие от Enterobacteriaceae (Lugtenberg, van Alphen, 1983), у *Rhizobium* для выявления основных белков наружной мембраны с помощью SDS-PAGE необходима предварительная обработка изолированных клеточных оболочек лизоцимом, что предполагает очень сильное, возможно, ковалентное взаимодействие этих белков с пептидогликаном. Эти белки относятся к двум различным группам (II и III) иммунологически родственных белков. Большинство представителей обеих групп может быть маркировано радиоактивной меткой при росте клеток в присутствии (³H)-N-ацетилглюкозамина. Было высказано предположение о том, что различия в молекулярной массе антигенов в пределах каждой группы связаны с варьирующим количеством остатков пептидогликана, присоединенных лишь к 2-3 белкам наружной мембраны (de Maagd et al., 1989b). Подобный феномен был также описан для липопотеина Брауна у *E. coli* (Wensink, Witholt, 1981). Другой отличительной чертой *Rhizobium* является формирование белками III группы олигомеров, стабилизированных дивалентными катионами (лучше всего Ca²⁺) и устойчивых к денатурации 2% SDS при 100°C (de Maagd et al., 1989b).

Экспрессия в *E. coli* гена *ropA* (от англ.: *Rhizobium* outer membrane protein) под *lac*-промото-ром приводила к появлению в наружной мембране Ca²⁺-стабилизированных олигомеров белка RopA. Таким образом, локализация RopA-подобных белков в наружной мембране и формирование ими олигомеров не являются уникальными характеристиками *R. leguminosarum*, в отличие от их способности связываться с молекулами пептидогликана, которая не реализуется при переносе в *E. coli*. Это может быть связано как с различиями между *E. coli* и *R. leguminosarum* по строению пептидогликана, в результате которых присоединение белков становится невозможным, так и с тем, что клетки *E. coli* лишены механизма, обеспечивающего такое присоединение (de Maagd et al., 1992).

На основе штамма RBL5523 был получен мутант RBL5523-ZA4, устойчивый к вирулентным фагам K2, K5 и RL38. У него отсутствуют высокоподвижные белковые антигены III группы (de

Maagd et al., 1989b). Эти результаты показывают, что утерянная подгруппа белков формирует трансмембранные стабилизированные кальцием олигомеры, ковалентно связанные с пептидогликаном, которые являются рецепторами упомянутых фавов.

II.Н. ВЛИЯНИЕ SYM-ПЛАЗМИДЫ И ИНДУКЦИИ *NOD*-ГЕНОВ НА СОСТАВ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ У *RHIZOBIUM*

Присутствие в штамме 248 *R. leguminosarum* bv. *viciae* Sym-плазмиды pRLJI не влияет на состав белков наружной мембраны. Только у Sym⁺ клеток в цитозольной фракции обнаруживается белок с молекулярной массой 24 кДа, идентифицированный как Rhi (de Maagd et al., 1988b). В результате индукции *nod*-генов штамм 248 не появляется новых белков, которые можно было бы отнести к продуктам этих генов. Появление в секретируемой фракции единственного белка с массой 50 кДа напрямую зависело от экспрессии гена *nodD* и присутствия индуктора *nod*-генов. Этот белок был идентифицирован позднее как собственно NodD (de Maagd et al., 1989d).

Метод клеточного фракционирования (de Maagd, Lugtenberg, 1986), в сочетании с применением антител послужил основой для локализации продуктов *nod*-генов в клетках ризобий. С использованием этой методики у *R. leguminosarum* bv. *viciae* белки NodD и NodI были выявлены в цитозоле (Schlaman et al., 1989, 1990), а также показано, что NodA присутствует как в мембранной фракции цитозоля, так и в цитоплазматической мембране (Schlaman et al., 1992). Первые данные по изучению локализации белка NodC (John et al., 1988) указывали на его присутствие в наружной мембране, но затем выяснилось, что он входит только в состав мембран цитозольной фракции (Barny, Downie, 1993).

II.1. ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА БЕЛКОВ ПРИ РАЗВИТИИ БАКТЕРОИДОВ

Типичной чертой дифференцировки клеток ризобий в бактериоиды является уменьшение количества антигенов II и III группы. Снижение содержания этих антигенов наблюдалось также у мутантов *R. leguminosarum* bv. *viciae* по генам *nifA* и *nifK* и при инокуляции штаммом дикого типа 248 не способного к азотфиксации мутанта гороха FN1. Эти данные показывают, что фиксация азота не является необходимым условием для изменения уровня антигенов (Roest et al., 1995a).

Белок RopA является низкомолекулярным компонентом двух семейств белков наружной мембраны, относящихся к III антигенной группе. Экспрессию гена *ropA* в ходе клубенькообразования изучали с помощью иммуно-электронной микроскопии и гибридизации *in situ*. Первый подход, примененный при изучении срезов клубеньков вики, подтвердил снижение уровня белка. Оно начинается после выхода бактерий из инфекционной нити в растительные клетки и продолжается во время морфологических изменений, сопряженных с дифференцировкой бактериоидов (de Maagd et al., 1994). Применение *in situ* гибридизации мРНК *ropA* на срезах клубеньков гороха выявило резкое падение уровня экспрессии этого гена при переходе из преинфекционной зоны II клубенька в интерзону II-III. Параллельно с падением экспрессии данного гена увеличивается уровень мРНК *nifH*. Экспрессия гена *nifH* начинается внезапно, и тот слой клеток, в котором это происходит, становится первым же слоем, в котором резко падает уровень экспрессии *ropA*, что указывает на возможность регуляции обоих генов одним и тем же механизмом. Хотя снижение уровня мРНК *ropA* и появление мРНК *nif*-генов пространственно сопряжены, их можно разделить при использовании штамма, индуцирующего появление на корнях гороха не фиксирующих азот клубеньков, в которых, тем не менее, происходит формирование бактериоидов (de Maagd et al., 1994). Следует отметить, что ген *ropA2*, кодирующий высокомолекулярную составляющую белковых антигенов III группы, на 91.8 % идентичен гену *ropA* на уровне последовательности нуклеотидов (Roest et al., 1995c). Возможно, что эти данные раскрывают не только судьбу RopA, но и всех остальных представителей III антигенной группы.

Попытки моделировать снижение содержания белков III группы инкубацией клеток *in vitro* в условиях, приближенных к существованию в клубеньке (низкое содержание кислорода и наличие

сукцината в качестве источника углерода), позволили выявить только то, что высокая концентрация Ca^{2+} подавляет экспрессию *ropA*. Остается неясным, могут ли клетки разных слоев сильно различаться по уровню кальция (Roest et al., 1995c).

III. Генетический контроль синтеза белков наружной мембраны

III.A. *ropA*

Белок RopA представляет собой низкомолекулярный (36 кДа) антиген III группы штамма 248 *R. leguminosarum* bv. *viciae*, он входит в состав наружной мембраны, где его уровень значительно снижается в ходе становления симбиоза. Ген *ropA* кодирует белок, состоящий из 366 аминокислот, с предполагаемой массой 39 кДа. Секвенирование N-терминальной части RopA подтвердило, что *ropA* является структурным геном для этого белка. После удаления сигнального пептида, состоящего из 22 аминокислот, образуется зрелая молекула RopA, расчетная масса которой составляет 37 кДа (de Maagd et al., 1992).

Гомолог гена *ropA* обнаружен у штамма LPR5020 *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. За исключением одной аминокислоты, N-терминальная часть этого белка, в которую входит 51 аминокислота, идентична RopA штамма 248 (Roest et al., 1995c).

III.B. *ropA2*

Для выявления структурных генов, кодирующих высокомолекулярную часть антигенов III группы, был выделен гомологичный *ropA* фрагмент ДНК. На уровне нуклеотидов он оказался на 91.8 % идентичен гену *ropA*. Этот фрагмент кодирует белок с массой 38.1 кДа и предполагаемым сигнальным пептидом (22 аминокислотных остатка). Зрелый белок, таким образом, должен весить около 36.1 кДа, что согласуется с цифрой 40 кДа, полученной с помощью SDS-PAGE анализа предполагаемого белка без заместителей. Сигнальный пептид RopA2 имеет такую же длину, как и RopA. Аминокислотная последовательность этих белков совпадает почти на 70% и оба они содержат C-терминальный фенилаланин, часто выявляемый в белках наружной мембраны. Эти данные показывают, что ген, обозначенный как *ropA2*, является вторым структурным геном антигенов III группы (Roest et al., 1995c). Его экспрессия приводит к появлению 4 дополнительных белковых компонентов.

III.C. *ropA* И *ropA2* ВОЗМОЖНО КОДИРУЮТ ПОРИНЫ

Для аминокислотных последовательностей, кодируемых генами *ropA* и *ropA2*, обнаружено 54-62% сходства с белками Omp2a и Omp2b соответственно. Эти белки выявлены у внутриклеточного паразита *Brucella abortus*, а соответствующие им гены, по-видимому, кодируют порины (Ficht et al., 1988, 1989). Сходство молекулярной массы кодируемых белков и высокие уровни экспрессии генов *ropA* и *ropA2* позволяют предположить, что они тоже кодируют порины. Показано, что после проникновения *B. abortus* в клетку животного уровень экспрессии *omp2b* значительно падает (Roest et al., 1995c). Подобный феномен обнаружен в бактероидах как для *ropA*, так и для *ropA2*.

III.D. *ropB*

Этот структурный белок наружной мембраны, относящийся к антигенной группе IIa, был изолирован у штамма LPR2120 *S. meliloti* с помощью моноклонального антитела Мат-8. Последовательность кодирующего его гена соответствует белку с предполагаемой молекулярной массой около 22.5 кДа. С учетом сигнальной последовательности из 23 аминокислот, значение молекулярной массы зрелого белка должно составлять 20.3 кДа, что соответствует данным, полученным с помощью SDS-PAGE (22 кДа). Ген *ropB* не экспрессируется в *E. coli* под собственным промотором.

RopB содержит С-терминальный фенилаланин, который необходим для эффективной транслокации белков наружной мембраны у других организмов. Предполагается, что основная часть вторичной структуры RopB представлена характерной для белков наружной мембраны β -складчатостью, состоящей из 10 аминокислот и носящей амфипатический характер. С учетом β -складчатости, пронизывающей мембрану, а также других показателей укладки белков наружной мембраны (Tommasen, 1988), была предложена топологическая модель белка RopB. Ген *ropB* консервативен у штаммов *Rhizobium* и *A. tumefaciens*. Не обнаружено гомологии по этому гену со штаммами *B. japonicum*, *P. fluorescens* и *E. coli* (Roest et al., 1995b).

III.E. РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ *ropA*, *ropA2* И *ropB*

Уровень белков, составляющих антигенную группу III штамма 248 *R. leguminosarum* bv. *viciae*, резко падает в ходе симбиоза. Структурными генами белков с меньшим и большим значениями молекулярной массы являются *ropA* и *ropA2* соответственно. У промотора гена *ropA* не обнаружено гомологии с известными регуляторными последовательностями. Он содержит два потенциальных сайта присоединения хозяйских регуляторных белков и неактивен в *E. coli* (de Maagd et al., 1992). Общими характеристиками *ropA* и *ropA2* являются: 1) наличие возможного сайта присоединения хозяйского фактора IHF (integration host factor); 2) отсутствие консенсус-последовательности для присоединения РНК-полимеразы. Других регуляторных консенсусов в этих генах не обнаружено (Roest et al., 1995c). Гомологии с известными последовательностями промоторов не удалось выявить и для гена *ropB*, кодирующего антиген II группы.

Уровень белка, кодируемого *ropB*, также снижается в ходе развития симбиоза. Среди многих проверенных средовых факторов не было обнаружено ни одного, при действии которого наблюдалась бы редукция эпитопа Mat8 до уровня, характерного для бактериоидов. В составе промотора *ropB* в пределах от -10—35 нуклеотидов не обнаружено последовательности для присоединения РНК-полимеразы.

Исходя из того, что антигены II и III групп отрицательно регулируются в процессе симбиоза у всех ризобий (Roest et al., 1995a), можно ожидать наличия консенсуса в промоторах структурных генов этих белков. Снижения уровня антигенов III группы в бактериоидах, выделенных из клубеньков *Phaseolus vulgaris* — растения с детерминированными клубеньками — выявлено не было (Roest et al., 1995c). Таким образом, регуляция антигенов II и III групп может проходить и с помощью различных, возможно, независимых механизмов. Эти данные также указывают на роль растения-хозяина в негативной регуляции синтеза антигенов наружной мембраны.

IV. Литература

- Bal A.K., Sen D., Weaver R.W. (1985) Curr. Microbiol. V. 12, p. 353-354.
Bal A.K., Wong P.P. (1982) Can. J. Microbiol. V. 28, p. 890-896.
Bamy M.A., Downie J.A. (1993) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 6, p. 669-672.
De Maagd R.A., de Rijk R., Mulders I.H.M., Lugtenberg B.J.J. (1989) J. Bacteriol. V. 171, p. 1136-1142.
De Maagd R.A., Lugtenberg B.J.J. (1986) J. Bacteriol. V. 167, p. 1083-1085.
De Maagd R.A., Mulders I.H.M., Canter Cremers H.C.J., Lugtenberg B.J.J. (1992) J. Bacteriol. V. 174, p. 214-221.
De Maagd R.A., Spaink H.P., Pees E., Mulders I.H.M., Wijffes A., Wijffelman C.A., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1989a) J. Bacteriol. V. 171, p. 1151-1157.
De Maagd R.A., van Rossum C., Lugtenberg B.J.J. (1988) J. Bacteriol. V. 170, p. 3782-3785.
De Maagd R.A., Wientjes F.B., Lugtenberg B.J.J. (1989) J. Bacteriol. V. 171, p. 3989-3995.
De Maagd R.A., Wijffelman C.A., Pees E., Lugtenberg B.J.J. (1988) J. Bacteriol. V. 170, p. 4424-4427.
De Maagd R.A., Wijffes A.H.M., Spaink H.P., Ruiz-Sainz J.E., Wijffelman C.A., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1989b) J. Bacteriol. V. 171, p. 6764-6770.
De Maagd R.A., Yang W.-C., Goosen-de Roo L., Mulders I.H.M., Roest H.P., Spaink H.P., Bisseling T., Lugtenberg B.J.J. (1994) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 7, p. 276-281.
Ficht T.A., Bearden S.W., Sowa B.A., Adams L.G. (1988) Infect. Immun. V. 56, p. 2036-2046.
Ficht T.A., Bearden S.W., Sowa B.A., Adams L.G. (1989) Infect. Immun. V. 57, p. 3281-3291.
Graham P.H. (1969) Analytical Serology of Bacteria, J. Wiley and Sons, NY, p. 353-378.
Humphrey B.A., Vincent J.M. (1962) J. Gen. Microbiol. V. 29, p. 557-561.

- Humphrey B.A., Vincent J.M. (1965) *J. Gen. Microbiol.* V. 41, p. 109-118.
- John M., Schmidt J., Wieneke U., Krussman H.D., Schell J. (1988) *EMBO J.* V. 7, p. 583-588.
- Lugtenberg B.J.J., Meyers J., Peters R., van der Hoek P., van Alphen L. (1975) *FEBS Lett.* V. 58, p. 254-258.
- Lugtenberg B.J.J., Peters R. (1976) *Biochim. Biophys. Acta.* V. 441, p. 38-47.
- Lugtenberg B.J.J., van Alphen L. (1983) *Biochem. Biophys. Acta.* V. 737, p. 51-115.
- Matthysse A.G., Holmes K.V., Curlitz R.H.G. (1981) *J. Bacteriol.* V. 145, p. 583-595.
- Melchers L.S., Thompson D.V., Idler K.B., Neuteboom S.T.C., de Maagd R.A., Schilperoort R.A., Hooykaas P.J.J. (1987) *Plant Molec. Biol.* V. 9, p. 635-645.
- Osborn M.J., Bander J.E., Parisi E., Carson J. (1972) *J. Biol. Chem.* V. 247, p. 3962-3972.
- Planque K., van Nierop J.J., Burgers A., Wilkinson S.G. (1979) *J. Gen. Microbiol.* V. 110, p. 151-159.
- Roest H.P., Goosen-de Roo L., Wijffelman C.A., de Maagd R.A., Lugtenberg B.J.J. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 14-22.
- Roest H.P., Mulders I.H.M., Wijffelman C.A., Lugtenberg B.J.J. (1995) *Mol Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 576-583.
- Roest H.P., Bloemendaal C.-J.P., Wijffelman C.A., Lugtenberg B.J.J. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 4985-4991.
- Schlaman H.R.M., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 5486-5489.
- Schlaman H.R.M., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 5177-5182.
- Schlaman H.R.M., Spaink H.P., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 4686-4693.
- Smit G., Kijne J.W., Lugtenberg B.J.J. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 4294-4301.
- Tommassen J. (1988) In: J.A.F. Op den Kamp (ed.), *NATO ASI Series, «Membrane Biogenesis»*, Springer-Verlag, Berlin, p. 352-373.
- van Alphen L., Havekes L., Lugtenberg B. (1977) *FEBS Lett.* V. 75, p. 285-290.
- van Brussel A.A.N., Planque K., Quispel A. (1977) *J. Gen. Microbiol.* V. 101, p. 51-56.
- Vincent J.M. (1962) *J. Gen. Microbiol.* V. 28, p. 658-663.
- Vincent J.M., Humphrey B.A. (1963) *Nature.* V. 199, p. 149-150.
- Vincent J.M., Humphrey J. (1968) *J. Gen. Microbiol.* V. 54, p. 397-405.
- Wensink J., Witholt B. (1981) *Europ. J. Biochem.* V. 113, p. 349-357.

Фосфолипиды и альтернативные мембранные липиды

Гейгер О.

I. Введение.....	74
II. Липидные компоненты.....	74
II.A. Липидные компоненты Rhizobiaceae.....	74
III. Генетический анализ метаболизма липидов.....	75
IV. Жирные кислоты Rhizobiaceae.....	75
IV.A. Жирные кислоты, содержащие гидроксигруппу.....	76
V. Биосинтез жирных кислот.....	77
V.A. Биосинтез жирных кислот у <i>Escherichia coli</i>	77
V.A.1. Инициация.....	77
V.A.2. Элонгация.....	79
V.A.3. Биосинтез ненасыщенных жирных кислот.....	80
V.A.4. Биосинтез циклопропановых жирных кислот.....	80
V.B. Биосинтез β -кетидов (поликетидов).....	81
V.C. Биосинтез жирных кислот у Rhizobiaceae.....	82
V.C.1. Ацилпереносящие белки ризобий.....	82
VI. Фосфолипиды у Rhizobiaceae.....	87
VII. Биосинтез фосфолипидов.....	87
VII.A. Биосинтез глицерол-3-фосфата.....	87
VII.B. Ацилирование глицерол-3-фосфата до фосфатидной кислоты.....	87
VII.C. Многообразие главных полярных групп.....	87
VII.C.1. Активация фосфатидной кислоты до CDP-диглицерида.....	87
VII.C.2. Биосинтез фосфатидилглицерола (PG).....	87
VII.C.3. Биосинтез кардиолипина (CL).....	89
VII.C.4. Биосинтез фосфатидилэтаноламина (PE).....	89
VII.C.5. Биосинтез фосфатидилхолина (PC).....	89
VIII. Обмен фосфолипидов.....	91
VIII.A. Цикл диацилглицерола.....	91
VIII.B. Цикл 2-ацилглицеролфосфоэтаноламина.....	91
IX. Регуляция биосинтеза фосфолипидов.....	91
X. Альтернативные мембранные липиды.....	93
X.A. Гликолипиды.....	93
X.B. Сульфолипиды.....	93
X.C. Липиды, содержащие аминокислоты.....	94
X.D. Гопанойдные липиды.....	95
X.E. Каротиноиды.....	95
XI. Амфифильные производные жирных кислот.....	96
XI.A. Биосинтез сигнальных молекул - <i>N</i> -ацетилгомосерин лактон.....	96
XII. Перспективы.....	97
XIII. Литература.....	97

I. Введение

Клеточная оболочка грам-отрицательных бактерий, таких как Rhizobiaceae, состоит из трех характерных слоев. Эти слои включают внутренние или цитоплазматические мембраны, пептидогликановый каркас и внешнюю мембрану. Обе мембраны содержат мембранобразующие липиды, обычно фосфолипиды, и белки (глава 3). Внешние мембраны содержат дополнительный компонент - липосахариды. В этой главе будет обсуждаться состав, функция и организация фосфолипидов и других мембранных липидов Rhizobiaceae.

Фосфолипидный состав у Rhizobiaceae более сложный, чем у *Escherichia coli*. В дополнение к фосфатидилглицеролу, кардиолипину (также называемому дифосфатидилглицеролом) и фосфатидилэтаноламину, также присутствуют метилированные производные фосфатидилэтаноламина, среди которых был найден фосфатидилхолин. Метаболизм фосфолипидов является частью системы липидного обмена. О наличии других интегрированных с мембраной липидов сообщалось только для некоторых членов семейства Rhizobiaceae. Сульфоллипиды найдены в симбиотических штаммах Rhizobiaceae. Гопаноиды, структурные родственники стероидов, выявлены у представителей рода *Bradyrhizobium*.

Структура жирных кислот, основных строительных блоков фосфолипидов, очень разнообразна. Такая сложность в структуре жирных кислот отражается в сложности выявления биосинтетических систем и ацилпереносящих белков.

II. Липидные компоненты

Изучение мембранных липидов *Escherichia coli* внесло значительный вклад в понимание процессов синтеза и функционирования мембранных липидов. Мембраны *E. coli* содержат три основных фосфолипида: фосфатидилэтаноламин (PE), фосфатидилглицерол (PG) и кардиолипин (CL). Основным фосфолипидом *E. coli* является PE, количество которого составляет 75% от суммарных фосфолипидов (Cronan, Rock, 1996). Относительное количество PG и CL зависит от фазы роста культур; PG преобладал в логарифмической фазе, тогда как CL накапливался в стационарной фазе. Фосфолипиды, нейтральные липиды и липопротеины *E. coli* имеют сходный состав жирных кислот, состоящий из насыщенных пальмитиновой (гексадекаеновой) кислоты и миристиновой (тетрадека(це)новой) кислоты, а также мононасыщенного пальмитолеата (*цис*-9-гексадекае(ци)новая кислота) и *цис*-вакцината (*цис*-11-октадекае(ци)новая кислота). Также присутствовали следы лауриновой (додециновой), стеариновой (*цис*-7-октадекае(деце)новой) и *цис*-7-тетрадециновой кислот (Cronan, Rock, 1996). Изучение липидного состава мембран *E. coli* показало, что внешняя мембрана по сравнению с цитоплазматической обогащена насыщенными жирными кислотами и PE (Lugtenberg, Peters, 1976). Как и другие грам-отрицательные бактерии, Rhizobiaceae кроме цитоплазматической мембраны обладают и внешней мембраной. Клеточная оболочка *R. leguminosarum* может быть разделена на фракции цитоплазматической и внешней мембран (Maagd, Lugtenberg, 1986). Фракционирование цитоплазматической и внешней мембран *S. meliloti* показало, что большинство фосфолипидов в обеих мембранах находятся в равных количествах, и только количество кардиолипина уменьшалось во внешней мембране (Hubac et al., 1992).

Синтез липидов у *E. coli* подразделяется на: (1) синтез жирных кислот, которые ответственны за гидрофобные свойства липидов, и (2) присоединение синтезированных жирных кислот к sn-3-глицеролфосфату, вызывающее добавление и модификацию полярных групп с образованием основных клеточных фосфолипидов.

II.A. ЛИПИДНЫЕ КОМПОНЕНТЫ RHIZOBIACEAE

Хотя фосфолипиды могут составлять более 90% липидов ризобий (Bunn, Elkan, 1971) и агробактерий (Kaneshiro, Magg, 1962), иногда регистрируется также существенное количество

нейтральных липидов. В их состав входят убихинон Q-10 (Collins, Jonts, 1981; Yamada et al., 1982), α -токоферолхинон (у ризобий) (Hughes, Tove, 1982), жирные кислоты и ацилглицеролы (Manasse, Corpe, 1967; Gerson, Patel, 1975; Das et al., 1979; Miller, Tremblay, 1983), метильные эфиры жирных кислот, спирты жирного ряда и углеводороды (Gerson, Patel, 1975; Miller, Tremblay, 1983).

III. Генетический анализ метаболизма липидов

Генетический анализ метаболизма липидов оказывается весьма сложным, потому что было получено очень немного ауксотрофных мутантов, у которых генетические эффекты были комплементарны присутствию липидов в культуральной среде. К настоящему времени описаны ауксотрофные мутанты, для роста которых необходимы жирные кислоты (Silbert, 1967) или глицерол-3-фосфат (Bell, 1974).

Другой способ отбора мутантов заключается в использовании тритиевых «самоубийц» (Rock, Stonan, 1985). Большие количества высокоактивного ^3H -меченного липидного предшественника вводили в мутируемые клетки, растущие при повышенной температуре (обычно 42°C), а затем меченные клетки хранили при -80°C . Во время хранения те клетки, которые способны синтезировать липиды, излучают при разложении радиоактивного предшественника и погибают, а те, которые несут мутации, не синтезируют липиды, сохраняют жизнеспособность из-за отсутствия радиоактивного предшественника.

Другой полезный метод для проведения скрининга мутантов, неспособных синтезировать липиды, включает автографию колоний (Raetz, 1975). Этот метод позволил успешно выделить мутанты *Rhizobium meliloti* дефицитные по синтезу фосфолипидной N-метилтрансферазы (de Rudder et al., 1997; рис. 1).

IV. Жирные кислоты Rhizobiaceae

Состав жирных кислот всех изученных штаммов Rhizobiaceae показывает, что, как и для *E. coli* пальмитат (16:0), пальмитолеат (16:1(9c)) и *цис*-вакцинат (18:1(11c)) являлись доминирующими жирными кислотами (табл. 1). Однако относительное количество *цис*-вакцината и его производных, выделенных у большинства представителей семейства Rhizobiaceae, было значительно выше, чем у *E. coli*. Одна из жирных кислот, производных *цис*-вакцината (18:1(11c)) – лактибацилловая кислота (*цис*-11,12-метиленоктадеценовая кислота; 19:0 цикло), она содержала циклопропановое кольцо на месте *цис*-двойной связи. Другие производные, среди них 11-метил-*цис*-вакцинат (11-Me-VA) могут быть представлены, как продукты лактибацилловой кислоты с разомкнутым кольцом (Gerson et al., 1975; рис. 2). Эти новые жирные кислоты еще не найдены у агробактерий (Gerson, Patel, 1975; Gerson et al., 1975; Mac Kezie et al., 1979). Жирнокислотный состав различных классов липидов определен для *Agrobacterium tumefaciens* (Hildebrand, Law, 1964), *R. meliloti* (Miller, Tremblay, 1983) и двух штаммов ризобий, эффективных на *Lotus pedunculatus* (Gerson, Patel, 1975). Сравнение жирнокислотного состава проведено для свободноживущих и симбиотических (бактероидных) форм ризобий (Gerson, Patel, 1975; Miller, Tremblay, 1983).

Сравнение хроматографических профилей жирных кислот 123 ризобияльных штаммов (Jarvis, Tighe, 1994) позволило идентифицировать жирные кислоты на основании времени их выхода при газожидкостной хроматографии (с использованием компьютерной программы «Микробная идентификационная система»). Показано, что все штаммы содержат соединения, имеющие время выхода, идентичное метильным эфирам жирных кислот (16:0, 17:0, 18:0) и жирным кислотам (19 *цикло*w9c). Однако дальнейшая характеристика их структуры при помощи масс-спектрометрии не была выполнена. Для ризобияльных штаммов получены различные характеристики жирных кислот. Только у *R. tropici* и *M. loti* отсутствуют соединения со временем выхода, соответствующим 16:1w7c, 16:0 3-ОН и 20:3w6,9,12c. Только у *R. leguminosarum* содержится соединение с таким же временем выхода, как и у 15:0 2-ОН. Только *M. loti* продуцируют соединения со временем выхода,

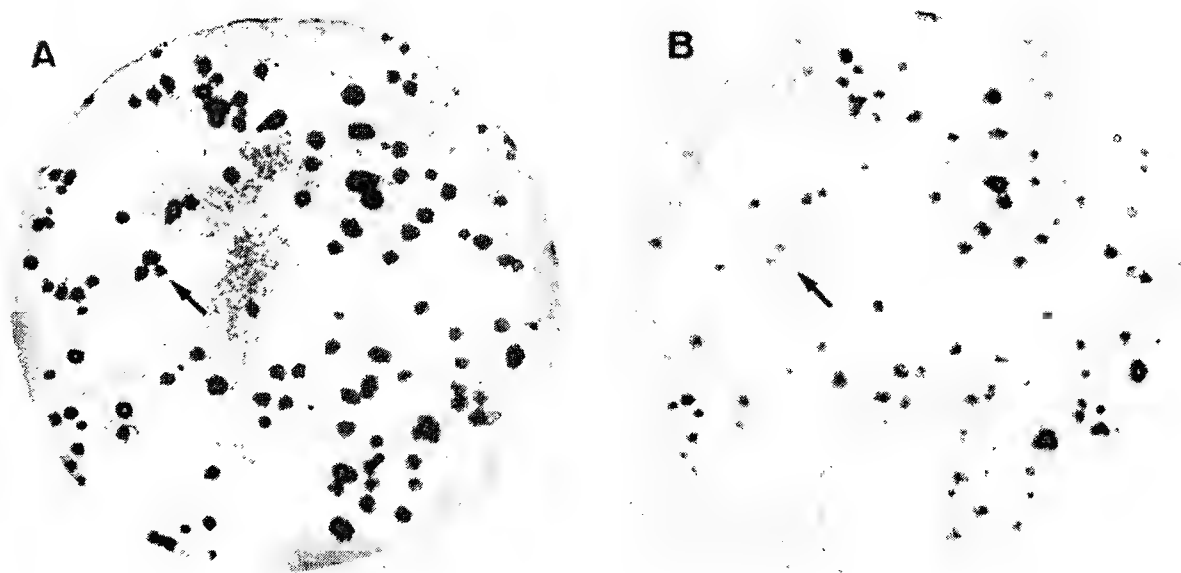


Рисунок 1. Выделение мутантов *S. meliloti*, дефицитных по синтезу фосфолипидной N-метилтрансферазы при помощи автографии колоний (de Rudder et al., 1997).

Колонии, подвергшиеся мутагенезу, выращиваемые на поверхности агара, переносили на лист фильтровальной бумаги методом отпечатков. Затем бумагу помещали в раствор, в котором колонии лизировались (мембраны и белки лизированных клеток связывались с поверхностью бумаги), после чего бумагу погружали в раствор, содержащий метаболический предшественник и буфер, необходимые для ферментативной реакции. Водорастворимый субстрат (*S*-аденозилметионин) имел радиоактивную метку. Имобилизированные лизированные клетки в течение короткого времени могли взаимодействовать с радиоактивным предшественником; затем фильтровальную бумагу промывали в растворе, в котором липиды не растворялись, но водорастворимые компоненты переходили в раствор. Отмытую бумагу обрабатывали специальной белковой краской, высушивали и экспонировали на гаммачувствительной пленке. Затем конечная авторадиграмма (В) сравнивалась с закрашенной фильтровальной бумагой (А). Идентифицировали колонии, которые не имели ферментативной активности (отмечены стрелками). Мутантные колонии изолировали из первичной агаровой пластины.

как у 12:0 3-ОН, 13:0-изо-3-ОН, 20:2w6,9с. Сравнение газофазной хроматографической профилей метиловых эфиров жирных кислот показало, что штаммы могут быть объединены в кластеры, соответствующие шести видам (*R. leguminosarum*, *S. meliloti*, *R. galegae*, *S. fredii*, *M. loti*, *R. tropici*). Профили жирных кислот описаны для каждого вида и позволяют с 95% точностью проводить идентификацию неизвестных штаммов ризобий (Jarvis, Tighe, 1994).

VI.A. ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ГИДРОКСИГРУППУ

Во время биосинтеза обычных жирных кислот образуются также 3-гидрокси жирные кислоты. У *Enterobacteriaceae* 3-гидрокси жирные кислоты и особенно 3-гидроксимиристиновая кислота - обычные ацильные заместители липида А, являющегося частью LPS. Кроме 3-гидрокси жирных кислот, *Rhizobiaceae* также содержат длинные (w-1)-гидрокси-жирные кислоты. Необычно длинная 27-гидроксиоктакозановая кислота определена как основной структурный ацильный компо-

нент липосахаридов *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Hollingsworth, Carlson, 1989). Многочисленные представители α -2 подгруппы протеобактерий содержат в липосахаридах длинные (w-1)-гидроксигирные кислоты (Bhat et al., 1981a). Среди этих микроорганизмов встречаются патогены, вызывающие «кошачью чесотку» у людей (English et al., 1988). У таких бактерий, по-видимому, отсутствует муреин клеточных стенок, но еще сохраняется 27-гидроксиктактозановая кислота в LPS. Считают, что необычно длинная 27-гидроксиктактозановая кислота проникает через все липидные слои внешней мембраны грам-отрицательных бактерий и что она может ковалентно связываться через свою (w-1)-гидроксигруппу с другими клеточными компонентами на внутренней стороне внешней мембраны, существенно повышая стабильность этих бактерий. Описана ферментная система, участвующая в переносе 27-гидроксиктактозановой кислоты на (Kdo)₂-липид IV_A (Brozek et al., 1996). Детализация систем, участвующих в переносе 27-гидроксиктактозановой кислоты может дать возможность получить специфические ингибиторы этих ферментов. Такие ингибиторы служат антибиотиками против патогенных бактерий, содержащих 27-гидроксиктактозановую кислоту в составе LPS.

Интересно отметить, что у *S. meliloti* длинные жирные (w-1)-гидроксикислоты были найдены не только в LPS, но и в специфических липохитоолигосахаридных сигнальных молекулах (Demont et al., 1994). Длина жирных кислот, найденных в ризобиальных сигнальных молекулах, колеблется между C18 и C26 и поэтому короче, чем длина жирных (w-1)-гидроксикислот из LPS. У *S. meliloti* синтез липохитоолигосахаридных сигнальных молекул контролируется регуляторными генами *nodD1*, *nodD2*, *nodD3* и *syrM*. Только активация *nodD3* или *syrM* приводит к синтезу липохитоолигосахаридов, которые замещены жирными (w-1)-гидроксикислотами (Demont et al., 1994). Эти результаты показывают, что гены *nodD* или их продукты специфически влияют на *nodA*-зависимую реакцию ацилтрансферазы в процессе биосинтеза липохитоолигосахаридов (глава 21).

V. Биосинтез жирных кислот

Биосинтез и перенос жирных кислот являются важнейшими процессами образования биологических мембран, запасных липидов, липопротеинов или определенных сигнальных молекул (ризобиальные липохитоолигосахариды или *N*-ацилгомосерин-лактоны, аутоиндукторы грам-отрицательных бактерий).

У животных биосинтез жирных кислот является мультиферментативным процессом. Все участвующие ферментативные активности локализованы на единственном многофункциональном полипептиде (Goodridge, 1991). У бактерий (Hale et al., 1987; Gouill et al, 1993; Cronan, Rock, 1996; Shen, Byers, 1996) и в пластидах растений (Slabas, Fawcett, 1992) биосинтез жирных кислот идет за счет каталитической активности ряда монофункциональных ферментов. Биосинтез жирных кислот происходит в две стадии - инициации и циклической элонгации (Cronan, Rock, 1996).

Биосинтез жирных кислот у Rhizobiaceae изучен недостаточно. Однако считают, что путь биосинтеза, показанный для *E. coli*, существует и у Rhizobiaceae. В последние годы в деталях изучен липидный метаболизм у штаммов *Rhodobacter sphaeroides* (которые как и Rhizobiaceae принадлежат к подгруппе α -протеобактерий), что может способствовать изучению липидного метаболизма у Rhizobiaceae.

V.A. БИОСИНТЕЗ ЖИРНЫХ КИСЛОТ У *ESCHERICHIA COLI*

V.A.1. Инициация

Предшественники биосинтеза жирных кислот происходят из пула ацетилкоэнзима А (ацетил-CoA). Первый шаг биосинтеза состоит в превращении ацетил-CoA под действием ацетил-CoA-карбоксилазы (ACC) в малонил-CoA. ACC состоит из двух белковых субкомплексов с различной ферментативной активностью. На первом шаге биотинкарбоксилаза (AccC) карбоксилирует биотинкарбоксил-переносящий белок (BCCP или AccB). Карбоксилтрансфераза осуществляет транспорт AccA и AccD карбоксильного остатка от карбокси-BCCP к ацетил-CoA, образуя малонил-

Таблица 1. Состав жирных кислот семейства *Rhizobiaceae*

Организм	Фаза роста (источник кислот)	Типы не гидроксиглированных жирных кислот (% от их суммарного количества)								Ссылки	
		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	17:cy	19:cy	11-Me-VA		Другие
<i>Rhizobium meliloti</i>	E(TC)	2	12	2	+	46	0	14	7	17	Mac Kenzie et al., 1979; Miller, Tremblay, 1983
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	E(TC)	1	9	2	+	50	0	9	18	11	Mac Kenzie et al., 1979
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	E(TC)	1	8	2	+	51	0	13	17	8	Mac Kenzie et al., 1979
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	E(TC)	1	6	1	+	63	0	9	15	5	Mac Kenzie et al., 1979
<i>Bradyrhizobium</i> <i>japonicum</i>	E(TC)	2	11	3	+	62	0	8	3	11	Mac Kenzie et al., 1979; Bunn et al., 1970
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Lupinus</i>)	E(TC)	2	13	8	+	66	0	3	3	5	Mac Kenzie et al., 1979
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Vigna</i>)	E(TC)	1	10	4	+	77	0	3	2	3	Mac Kenzie et al., 1979
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Lotus pedunculatus</i>)	ND(C-PL)	ND	13	1	7	46	ND	3	10	20	Gerson, Patel, 1975
<i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i>	ND(C-REL)	1	22	6	0	30	0	41	0	0	Das et al., 1979; Kaneshiro, Marr, 1962
<i>A. stellulatum</i>	E(C-REL)	Следы	4	1	1	93	0	0	0	Следы	Oliver, Colwell, 1973a

E — экстенсимальная фаза; TC — целые клетки; C-PL — клеточные фосфолипиды; C-REL — липиды, экстрагированные из клеток;
ND — нет данных.

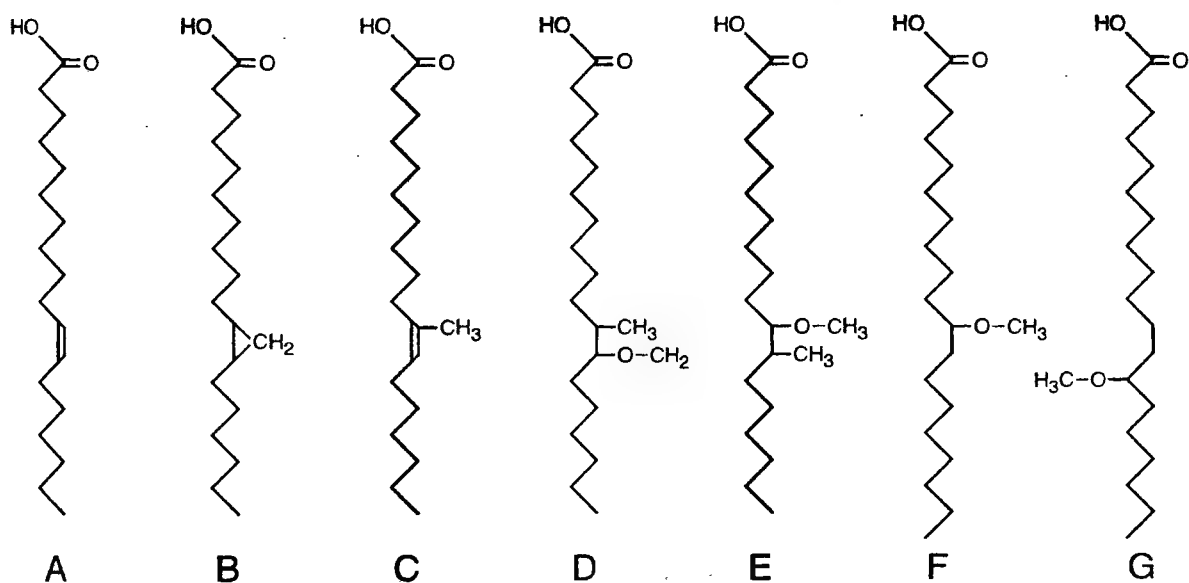


Рисунок 2. Необычные жирные кислоты, происходящие из *cis*-вакцината.

A - *cis*-вакцинат, B - лактобацилловая кислота (Gerson et al., 1975), C - 11-метилвакцинат (11-метилоктадек-11-еноат; 11-Me-VA), D - метокси-11-метилстеарат, E - 11-метокси-12-метилстеарат, F - 11-метоксинонадеканоат, G - 13-метоксинонадеканоат.

CoA. Малонил-АСР синтезируется из малонил-CoA при помощи малонил-CoA:АСР-трансферазы (FabD). Ацетил-АСР образуется как декарбоксилированием малонил-АСР, катализируемым одним из конденсирующих ферментов (β -кетоацил-АСР-синтетаза I), так и из ацетил-CoA. Ацетил-CoA-АСР-трансцилаза и β -кетоацил-АСР-синтетаза III могут катализировать у ацетил-CoA обмен АСР на CoA (рис. 3).

V.A.2. Элонгация

Удлинение жирных кислот на C2-единицы является циклическим процессом, каждый цикл состоит из следующих реакций: конденсации, первой редукции, дегидратации и последующей редукции (рис. 4).

Конденсирующий фермент β -кетоацил-АСР-синтетаза III (FabH) для образования ацетоацетил-АСР использует малонил-АСР и ацетил-АСР. Конденсация малонил-АСР и ацетил-АСР катализируется β -кетоацил-АСР-синтетазой I (FabB) или β -кетоацил-АСР-синтетазой II (FabF) с получением ацетоацетил-АСР. Выделение CO_2 сопутствует этой реакции. Три конденсирующих фермента показывают различное сродство к своим ацильным субстратам. Принимая во внимание, что FabH использует только ацетил-CoA, средне- и длинноцепочечные ацетил-АСР должны конденсироваться FabB и FabF. β -кетоацил-АСР восстанавливается NADPH-зависимой β -кетоацил-АСР редуктазой (FabG) с образованием β -D-гидроксиацил-АСР.

Молекулы воды удаляются с β -гидроксиацил-АСР-дегидротазы FabA или FabZ, образуя *транс*-еноил-АСР (Heath, Rock, 1996). Еноилредуктаза (FabI) при восстановлении еноил-АСР до насыщенного ацил-АСР может использовать либо NADPH, либо NADH (Bergler et al., 1996).

Образующийся ацил-АСР может в свою очередь служить субстратом для другой реакции конденсации. Повторяющаяся элонгация приводит к образованию пальмитиновой кислоты в связан-

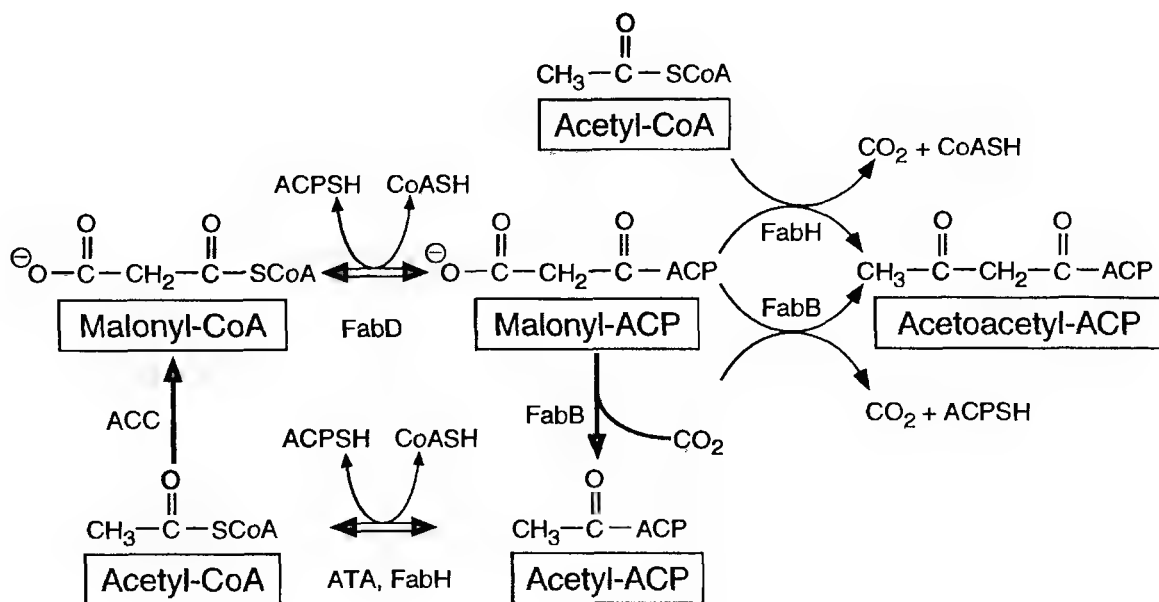


Рисунок 3. Метаболический путь инициации биосинтеза жирных кислот.

ной форме пальмитоил-ACP (используемой при биосинтезе фосфолипидов), а также, если дегидратация и второе восстановление не происходит, к образованию β-гидроксимиристоил-ACP (используемый при биосинтезе липида A).

V.A.3. Биосинтез ненасыщенных жирных кислот

В течение элонгации β-гидроксиацил-ACP-дегидратаза FabA может не только удалять воду, но и катализировать изомеризацию *транс*-2-деценил-ACP в *цис*-2-деценоил-ACP (Bloch, 1971; рис. 5), что важно для элонгации и конденсации *цис*-2-деценоил-ACP и малонил-ACP (Health, Rock, 1996). Конденсация пальмитоил-ACP и малонил-ACP катализируется FabF, иницируя, таким образом, элонгацию *цис*-вакценил-ACP. Ферментативная активность FabF необычным образом зависит от температуры. Активность высока при низкой температуре (25°C) и сильно уменьшается при высокой температуре (37°C). Соответственно, больше *цис*-вакценовой кислоты (и соответственно большая доля ненасыщенных жирных кислот) образуется при низких температурах. Именно белок FabF отвечает за терморегуляцию биосинтеза жирных кислот у *E. coli*.

V.A.4. Биосинтез циклопропановых жирных кислот

Синтез циклопропановых жирных кислот (CFAs) происходит, когда субстрат ненасыщенных жирных кислот уже этирифицирован в локализованных в мембранах фосфолипидных молекулах. CFA-синтаза (Cfa) катализирует метилирование *цис*-двойных связей, метильным донором является S-аденозилметионин (SAM). Получены мутанты, которые полностью лишены CFA-синтазной активности. Они растут и развиваются при всех нормальных условиях. Единственным исключением является то, что *cfa*-мутанты более чувствительны к режиму «замораживание-оттаивание», чем изогенные штаммы дикого типа (Grogan, Cronan, 1986). Основной синтез CFA происходит, когда бактерии еще только входят в стационарную фазу, а затем снижается в стационарной фазе роста культур (Wang, Cronan, 1994).

V.V. БИОСИНТЕЗ β -КЕТИДОВ (ПОЛИКЕТИДОВ)

Биосинтез жирных кислот - частный случай общего синтеза поликетидов, который был выявлен у *Streptomyces* (Hopwood, Sherman, 1990; Cane, 1994). Поликетиды образуются путем повторяющейся конденсации C2 единиц, приводящей к возникновению мульти- β -кето-соединений. Основным примером такого биосинтеза являются антибиотики - β -кетиды (тетрациклин), получающийся при циклизации β -кетидов.

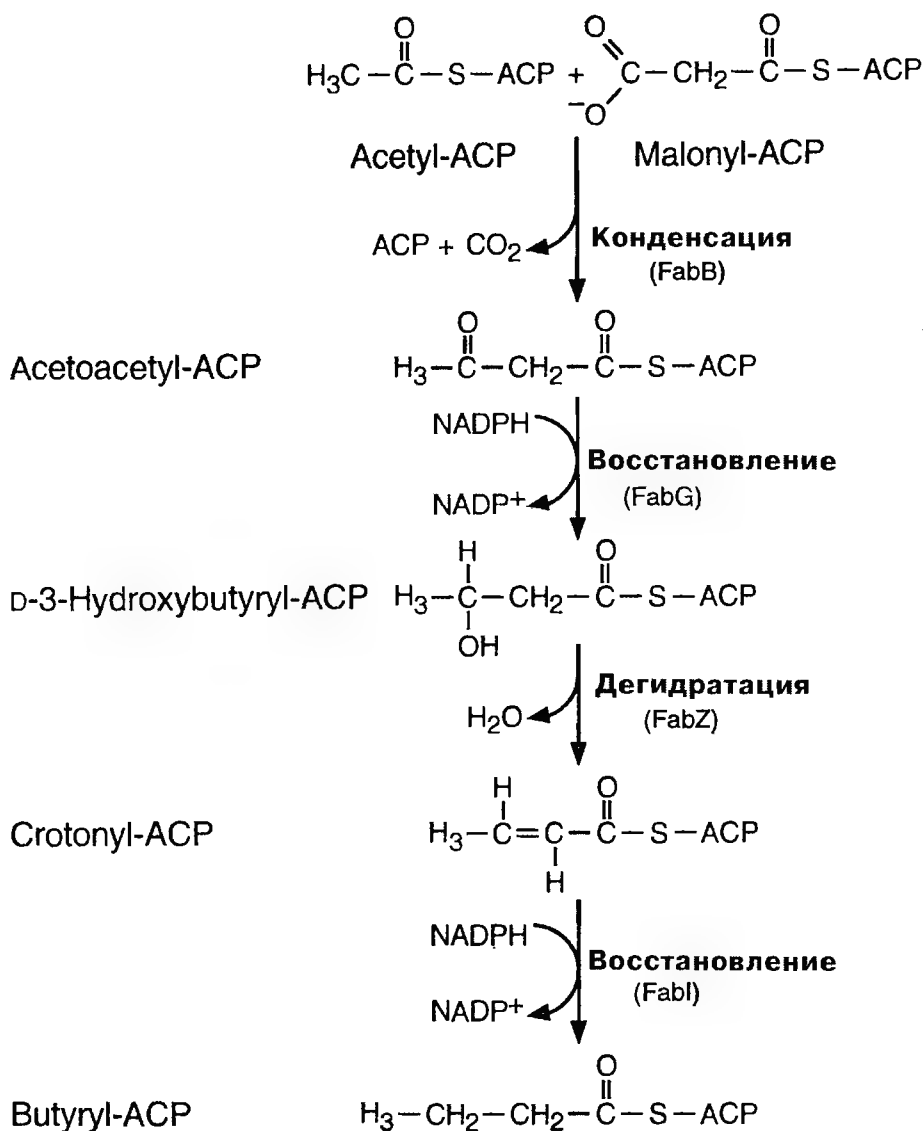


Рисунок 4. Биосинтез жирных кислот. Цикл элонгации.

V.C. БИОСИНТЕЗ ЖИРНЫХ КИСЛОТ У RHIZOBIACEAE

Для роста *Rhizobium meliloti* необходим биотин как кофактор для ряда карбоксилаз (Streit et al., 1996). Двуокись углерода является необходимым субстратом для роста *R. meliloti* (Lowe, Evans, 1962). Эта потребность, по-видимому, есть следствие активности карбоксилазных ферментов у *Rhizobium*, в которые входят определяемые у *R. meliloti*, пропионил-CoA- и ацетил-CoA-карбоксилазы (de Hertog et al., 1964) и пируваткарбоксилаза (Ronson, Primerose, 1979).

V.C.1. Ацилпереносящие белки ризобий

Ацилпереносящие белки (ACP) у *E. coli* являются небольшими (молекулярный вес 8860), кислыми (изоэлектрическая точка 3.8) белками, которые переносят 4'-фосфопантетеиновую простетическую группу (рис. 6), связанную через фосфатную сложноэфирную связь с Ser-36. ACP могут переносить жирные кислоты, которые затем связываются через сульфогидрильные группы, образуя тиоэфир (Jackowski et al., 1991).

Бактериальные ACP могут участвовать не только в синтезе цепочек жирных кислот, но также и фосфолипида, липида А (Jackowski et al., 1991) или гемолизина (Issartel et al., 1991). Все эти функции у *E. coli* реализуются при помощи единственного ACP, который непрерывно синтезируется и составляет около 0.25% от общего количества растворимого белка клетки (Rock, Cronan, 1979). Этот конститутивный ACP абсолютно необходим для организма и кодируется геном *acpP* (Rawlings, Cronan, 1992). К настоящему времени у *E. coli* известно, по крайней мере, 14 белков (Aas, AcpS, FabA, FabB, FabD, FabF, FabG, FabH, FabI, FabZ, LpxA, MdoH, PlsB, PlsC), взаимодействующих во время их ферментативных реакций с белком AcpP.

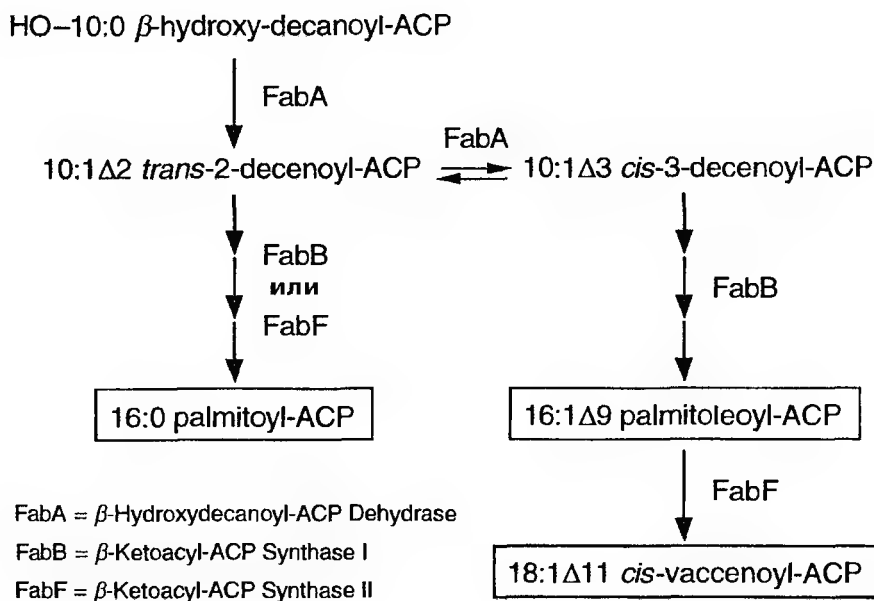


Рисунок 5. Биосинтез цис-вакцината.

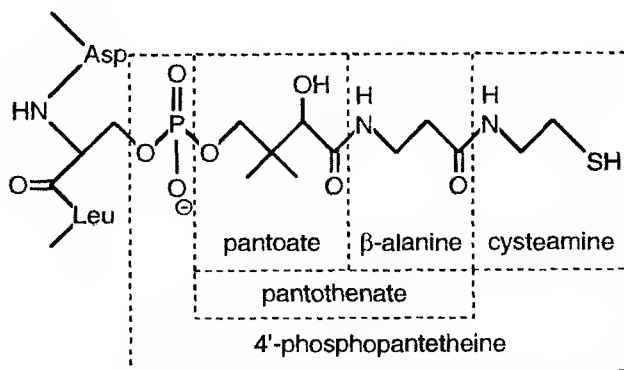


Рисунок 6. Простетические группы ацил-переносящих белков: 4'-фосфопантетин.

Некоторые бактерии в дополнение к конститутивному АСР имеют индуцибельный АСР, который участвует в биосинтезе специальных β-кетидов (Bibb et al., 1989; Sherman et al., 1989; Khosla et al., 1992, 1993; Crosby et al., 1995; Revill et al., 1996). У ризобий индуцибельным является белок NodF, который необходим для образования азотфиксирующих клубеньков на корнях растений (Geiger et al., 1991a).

Недавно было получено доказательство того, что кроме конститутивного АсрР и индуцибельного NodF, у ризобий существует по крайней мере два дополнительных АСР. Первый был идентифицирован как продукт ORF (открытая рамка считывания) в группе комплементации в локусе *fix-23* *S. meliloti* (Petrovics et al., 1993). Еще один новый АСР у *R. leguminosarum* участвует в биосинтезе липида А при транспорте необычно длинной 27-гидроксиоктакозановой кислоты к цепочке сахаров (Brozek et al., 1996).

Конститутивный АсрР из *S. meliloti*. Ацилпереносящие белки, участвующие в синтезе липидных эфиров, экспрессируются на конститутивном уровне. По-видимому, клетка не способна воспринимать даже незначительные изменения в уровнях экспрессии (Rawlings, Cronan, 1992). После первоначальной характеристики АсрР из *E. coli* были изучены многочисленные конститутивные ацил-переносящие белки бактерий (Cooper et al., 1987; Froelich et al., 1990; Revill, Leadlay, 1991; Morbidoni et al., 1996; Shen, Byers, 1996) и растений (Simoni et al., 1967; Hoj, Svendsen, 1983; Post-Beittenmiller et al., 1989; Souciet, Weil, 1992). Среди них были выявлены конститутивные ацилпереносящие белки (АсрР) из *S. meliloti* (Platt et al., 1990). Как и АсрР из *E. coli*, так АсрР из *S. meliloti* может ацилироваться при помощи АСР-ацилазы, выделенной из *E. coli* (Platt et al., 1990). Однако ризобиальный АсрР не может заменять АсрР из *E. coli* в качестве кофактора при трансглюколизации (Platt et al., 1990), необходимой для синтеза мембран-связанных олигосахаридов (МДО) у *E. coli* (Therisod et al., 1986; Therisod, Kennedy, 1987).

Нодуляционные белки NodF из *Rhizobium* как ацилпереносящие белки. В симбиотических взаимодействиях *Rhizobium* с их растениями-хозяевами, которые приводят к образованию азотфиксирующих клубеньков, флавоноиды, выделяемые корнями растений, индуцируют ризобиальные гены клубенькообразования (*nod*). Продукты *nod*-генов - сигнальные молекулы (липохитоолигосахариды), способные инициировать образование клубеньков у бобовых растений (глава 21).

Некоторые ризобии (*S. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii*) продуцируют липохитоолигосахариды, содержащие насыщенные жирные кислоты (Lerouge et al., 1990; Schultze et al., 1992; Spaink et al., 1991, 1995). Насыщенными жирными кислотами в липохитоолигосахаридах *S.*

meliloti являются *транс*-2-*цис*-9-гексадекадиеновая (Lerouge et al., 1990) или *транс*-2, *транс*-4, *цис*-9-гексатриеновая кислоты (Schultze et al., 1992). У липохитоолигосахаридов *R. leguminosarum* bv. *viciae* до сих пор найдена только одна насыщенная жирная кислота - *транс*-2, *транс*-6, *цис*-11-октадекатетраеновая (Spaink et al., 1991; Firmin et al., 1993), тогда как липохитоолигосахариды из *R. leguminosarum* bv. *trifolii* могли содержать насыщенные C18 (C18:3) или C20 (C20:3 или C20:4) остатки жирных кислот (Spaink et al., 1995). Эти ризобии характеризуются узкой хозяйской специфичностью (глава 18).

Относительно давно установлено, что бактериальные гены *nodF* и *nodE*, определяющие хозяйскую специфичность, имеют небольшую, но выраженную гомологию с генами, кодирующими ацил-переносащий белок и β -кетоацилсинтазу *E. coli*, соответственно. К настоящему времени секвенированы гены *nodFE* из *S. meliloti* (Debelle, Sharma, 1986; Horvath et al., 1986), *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Shearman et al., 1986), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Schofield, Watson, 1986) и *Rhizobium* sp. штамм N33 (Cloutier et al., 1997). Недавно сообщалось, что липохитоолигосахариды из *R. huakuii* и *R. galegae* также содержат высоконасыщенные жирные кислоты (Debelle et al., 1997). Эта находка также предполагает существование у *R. huakuii* и *R. galegae* генов *nodFE*.

Мутанты, не имеющие генов *nodF* или *nodE*, не способны синтезировать липохитоолигосахариды, замещенные насыщенными жирнокислотными ацильными цепочками. Когда гены *nodFE* из *R. leguminosarum* вводятся в *nodFE*-дефицитный штамм *S. meliloti*, у липохитоолигосахаридов образуются заместители из цепочки насыщенных C18 жирных кислот с размером, таким же как у *R. leguminosarum* (Demont et al., 1993). Однако, если *nodFE*-гены из *R. leguminosarum* экспрессируются в *S. meliloti*, то, как заместитель у липохитоолигосахаридов образуется не только *транс*-2, *транс*-6, *цис*-11-октадекатетраеновая кислота, но также *транс*-2, *транс*-4, *цис*-11-октадекатетраеновая кислота и *транс*-2, *цис*-11-октадекадиеновая кислота (Demont et al., 1993).

Исследование биосинтеза насыщенных жирных кислот у *R. leguminosarum* показало, что после индукции генов *nodFE*, даже в отсутствии генов *nodABC*, синтезируется *транс*-2, *транс*-6, *цис*-11-октадекатетраеновая кислота, которая характеризуется максимумом поглощения при 303 нм (Geiger et al., 1994a). Это указывает на то, что биосинтез необычных жирных кислот не зависит от синтеза липохитоолигосахаридов, а также что биосинтез насыщенных жирных кислот происходит перед их присоединением к цепочке сахаров липохитоолигосахаридов.

При попытке идентифицировать липидную фракцию, к которой содержатся необычные C18:4 жирные кислоты, было показано, что они в позиции sn-2 связываются с фосфолипидами (Geiger et al., 1994a). Кроме того, они содержат другие жирные кислоты, контролируемые генами *nodFE* - C18:4 *транс*-4, *транс*-6, *цис*-11-октадекатриеновая кислота, которая имеет максимум поглощения при 225 нм и C18:2 октадекадиеновая кислота, не имеющая специфического максимума в спектре поглощения (Geiger et al., 1997). Даже тогда, когда липохитоолигосахаридные сигналы продуцируются клетками ризобий дикого типа, фракция этих ненасыщенных жирных кислот также связана с основными фосфолипидами (Geiger et al., 1994a, 1997). Ни *транс*-4, *транс*-6, *цис*-11-октадекатриеновая, ни октадекадиеновая кислоты не выявляются в липохитоолигосахаридах (Spaink et al., 1991). Хотя фосфолипиды с насыщенными жирнокислотными остатками, контролируемые генами *nodFE*, не проявляют активности в биотестах, которые обычно используют для определения морфогенетической активности липохитоолигосахаридных факторов (Geiger et al., 1994b), их участие в образовании клубеньков не может быть исключено.

Спектр контролируемых *nodFE*-генами насыщенных ацильных жирнокислотных остатков у фосфолипидов и липохитоолигосахаридов не является идентичным. Эти данные дают основание предположить, что белок NodA, ответственный за синтез *N*-ацилтрансферазы, при прикреплении ацильного жирнокислотного заместителя к цепочке сахаров у липохитоолигосахаридов, не переносит на липохитоолигосахариды все жирные кислоты, синтезируемые при участии белков NodFE. Скорее всего, он селективно переносит α - β -ненасыщенные жирные кислоты. По этой и другим причинам появляются сомнения насчет принадлежности *nodA* к числу общих *nod*-генов, и обсуждается способность NodA осуществлять функцию специфичного по отношению к хозяину переносчика жирных кислот при биосинтезе Nod-факторов (Debelle et al., 1996; Ritsema et al., 1996; Roche et al., 1996). Предложена схема (рис. 7), которая может объяснить, как в действительности достига-

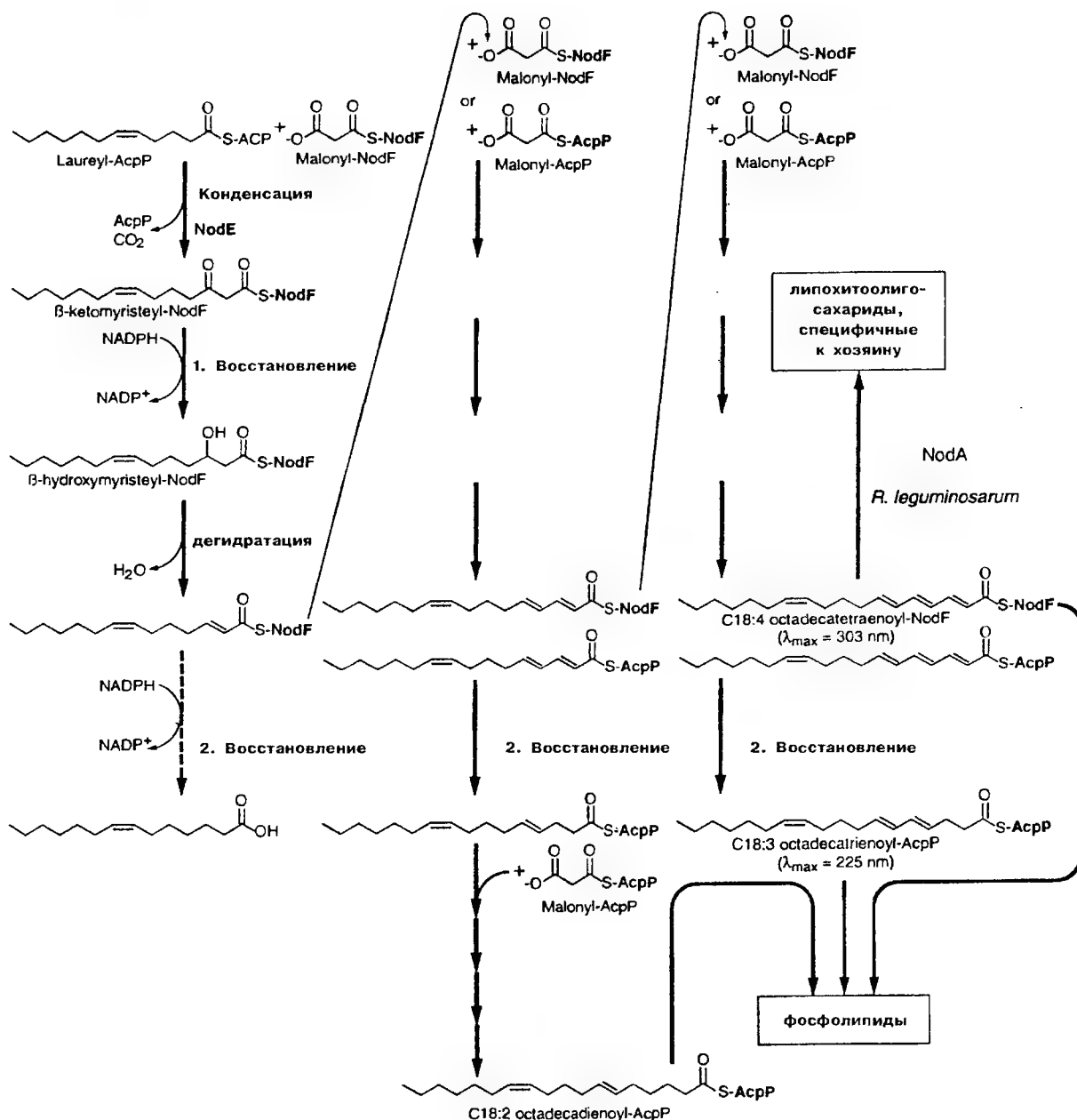


Рисунок 7. Биохимическая функция белка NodF (Geiger et al., 1997).

ется селективность для α - β -ненасыщенных жирных кислот при специфических взаимодействиях между белками NodA и NodF (Geiger et al., 1997).

Белок NodF из *R. leguminosarum* bv. *viciae* был детально охарактеризован. В качестве функционального компонента у NodF является 4'-фосфопантетеиновая протестическая группа, которая характерна для ацил-переносящих белков (Geiger et al., 1991a). Когда сериновый остаток в поло-

жении 45 замещается на треонин, альтернативный NodF белок S45T не может далее замещаться 4'-фосфопантетеином, при этом становясь неактивным в отношении своих биохимических и биологических функций (Ritsema et al., 1996). Последние ЯМР-исследования структурных особенностей белка NodF показали, что он имеет три хорошо сформированных спирали, которые свертываются в параллельные структуры, имеющие соединение простетических групп около начала второй спирали (Ghose et al., 1996). Поэтому, несмотря на ограниченную гомологию последовательности с белком AcpP из *E. coli*, структурная (пространственная) гомология сохранялась. Для того чтобы понять структурную основу специализации NodF были сконструированы химерные гены, содержащие часть *nodF*-генов и часть *acpP*-генов из *E. coli*. Интересно, что гибрид ACP, содержащий N-концевую часть от AcpP и C-концевую часть от NodF, был способен выполнять функции NodF при образовании клубеньков (Ritsema et al., 1997).

Белок RkpF из *Rhizobium meliloti*. Известно, что бактериальные экзополисахариды (EPS) и липополисахариды (LPS) играют важную роль в растительно-бактериальных взаимодействиях. Лocus *fix-23* из *Rhizobium meliloti* (штамм 41) может компенсировать мутацию (*exo*), вызывающую дефицит экзополисахаридов во время образования симбиотических клубеньков. Этот locus отвечает за продукцию новых полисахаридов, называемых К-подобными антигенами, которые богаты 3-дезоксид-манно-2-октулозой кислотой (Kdo), и отличаются от классических LPS (Reuhs et al., 1993; глава 7). Одна из четырех единиц комплементации локуса *fix-23* (единица 1), содержащая 6 открытых рамок считывания (ORF), кодирует белковые продукты, которые имеют сходство с аналогичной системой, находящейся в жирнокислотной синтетазе мультифункционального ферментного домена у крыс. Шесть ORF, по-видимому, кодируют новые ацилпереносящие белки (ACP), которые названы RkpF (Reuhs et al., 1996; Kiss et al., 1997; Petrovics et al., 1997).

Недавно ген *rkpF* был клонирован и кодируемый им белок (RkpF) сверхпродуцирован в *E. coli* (Erple et al., 1997). После очистки белок RkpF выявлялся при электрофорезе в натрий-додецилсульфатполиакриламидном геле в виде одной зоны с молекулярным весом 5000. Белок RkpF может быть эффективно помечен *in vivo* при помощи радиоактивного β-аланина, добавляемого в культуральную среду. Если гомогенный RkpF белок инкубировали *in vitro* с меченным коэнзимом А (CoA) в присутствии очищенной холо-ACP-синтетазы (AcpS) из *E. coli* (Lambalot, Walsh, 1995), то наблюдался перенос 4'-фосфопантетеина на белок RkpF. Конверсия апо-RkpF в холо-RkpF, по-видимому, сопровождается большими конформационными изменениями структуры, так как холо-белок при электрофорезе на нативном полиакриламидном геле движется быстрее, чем апо-белок (Erple et al., 1997).

Таким образом, у *S. meliloti* кроме конститутивного AcpP и флавоноид-индуцированного нодуляционного белка NodF, существует, по крайней мере, еще один 4'-фосфопантетеин-переносящий небольшой, кислый белок RkpF, предположительно функционирующий как новый ACP при биосинтезе еще неизвестного β-кетиды.

Белок AcpXL из *Rhizobium leguminosarum*. Липид А, входящий в состав липоолигосахаридов во внешней мембране грамотрицательных бактерий, у членов семейства Rhizobiaceae ацилирован 27-гидроксиоктакозановой кислотой (Bhat et al., 1991a, 1991b). Описана система *in vitro*, содержащая мембранные фермент и цитозольный ацильный донор из *R. leguminosarum*, которые переносят 27-гидроксиоктакозановую кислоту к (Kdo)₂-липиду IV_A, предшественнику биосинтеза липида А (Brozek et al., 1996). Ацильный донор был очищен и анализ аминотерминальной последовательности показал сходство с продуктом частично секвенированного гена (*orf**) *R. leguminosarum* (Colonna-Romano et al., 1990). Когда ген *orf** был полностью секвенирован, оказалось, что он кодирует белок из 92 аминокислот, используемый для присоединения 4'-фосфопантетеина и называемый AcpXL. Масс-спектрометрия очищенного AcpXL показала присутствие 27-гидроксиоктакозановой кислоты. Другие крупные пики показали ацилирование AcpXL w-1-гидроксилированным жирнокислотным ацильным остатком (C18-C26). У *S. meliloti* этот остаток объединяется с *nodD3*-зависимыми липохитинолигосахаридами (Demond et al., 1994). Поэтому можно ожидать, что AcpXL присутствует у *S. meliloti* и других бактерий, содержащих 27-гидроксиоктакозановую кислоту.

VI. Фосфолипиды у Rhizobiaceae

Основные фосфолипиды у Rhizobiaceae, как и у *E. coli*, представлены фосфатидилглицеролом (PG), кардиолипином (CL) и фосфатидилэтаноламином (PE). Однако Rhizobiaceae также содержат значительное количество метилированных производных PE: монометил-фосфатидилэтаноламин (MMPE), диметилфосфатидилэтаноламин (DMPE) и фосфатидилхолин (PC) (табл. 2).

Повторные исследования состава фосфолипидов у *Bradyrhizobium* (Miller et al., 1990) показали, что несмотря на ранние сообщения (Bunn et al., 1970; Bunn, Elkan, 1971), PG присутствуют в основных фосфолипидах, в то время как фосфатидилсерин (PS) и фосфатидилинозитол (PI) не обнаруживаются (Miller et al., 1990).

Один или оба MMPE и DMPE могут также формироваться у *Agrobacterium rhizogenes*, *A. radiobacter* и *A. tumefaciens* (Goldfine, Ellis, 1964). Однако существуют противоречивые сообщения о том, накапливаются ли PC в стационарной фазе роста клеток названных штаммов (Randle et al., 1969; Das et al., 1979).

VII. Биосинтез фосфолипидов

Наиболее полные исследования пути биосинтеза фосфолипидов, как и биосинтеза жирных кислот, выполнены для *E. coli*.

VII.A. БИОСИНТЕЗ ГЛИЦЕРОЛ-3-ФОСФАТА

Глицерол-3-фосфат образует цепочки у всех фосфолипидных молекул. Они могут синтезироваться двумя различными путями:

1. Во время роста на глицерине в качестве единственного источника углерода индуцируется оперон катаболизма глицерина (*glp*). Один из индуцируемых ферментов - глицеринкиназа способен фосфорилировать глицерин и формировать глицерол-3-фосфат.

2. При росте на других источниках углерода глицерол-3-фосфат образуется путем прямой редукции промежуточного продукта гликолиза дигидроацетонфосфата (DHAP) с NADH. Фермент, катализирующий эту реакцию, называется глицерол-3-фосфат-дегидрогеназой (GpsA) (Bell, 1974). Весь дальнейший биосинтез фосфолипидов определяется мембранными ферментами.

VII.B. АЦИЛИРОВАНИЕ ГЛИЦЕРОЛ-3-ФОСФАТА ДО ФОСФАТИДНОЙ КИСЛОТЫ

Глицерол-3-фосфат-ацетилтрансфераза (PlsB) катализирует первое ацилирование глицерол-3-фосфата в положении 1. Вторая жирная кислота присоединяется при помощи фермента 1-ацил-глицерол-3-фосфат-ацетилтрансферазы (PlsC) с образованием фосфатидной кислоты (PA). Как правило, большинство жирных кислот в положении 1 являются ненасыщенными, в то время как большинство кислот в положении 2 - насыщенными. Такая специфика ацилирования не является абсолютной и может меняться при добавлении ацильных доноров (рис. 8).

VII.C. МНОГООБРАЗИЕ ГЛАВНЫХ ПОЛЯРНЫХ ГРУПП

VII.C.1. Активация фосфатидной кислоты до CDP-диглицерида

Конверсия фосфатидной кислоты до CDP-диглицерида (CDP-диацилглицерол) катализируется CDP-диглицеридсинтазой (CdsA) (рис. 9).

VII.C.2. Биосинтез фосфатидилглицерола (PG)

Фосфатидилглицерол-фосфатсинтаза (*PgsA*) переносит глицерол-3-фосфат на CDP-диглицерид при расщеплении CMP, таким образом, продуцируя фосфатидилглицерол-фосфат (PGP).

Таблица 2. Состав фосфолипидов бактерий семейства Rhizobiaceae

Организм	Фаза роста (источник липидов)	Типы фосфолипидов (% от их общего количества)									Ссылка
		PE	PG	CL	PC	DMPE	MMPE	PS	PI	Другие	
<i>Rhizobium meliloti</i>	S(C)	22	11	11	27	4	22	0	0	ND	Thompson et al.,
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	ND(C)	20	33	22	25	+	0	0	0	0	Faizova et al., 197
<i>Bradyrhizobium</i> (<i>Lotus pedunculatus</i>)	ND(C)	40	0	16	31	0	0	13	0	0	Bunn, Elkan, 1971
<i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i>	S(C)	18	13	19	28	0	16	0	0	6	Randle et al., 1969
<i>A. stellulatum</i>	E(C)	50	27	3	4	0	0	0	0	16	Oliver, Colwell, 19

Е — экспоненциальная фаза; S — стационарная фаза; C — целые клетки; + присутствуют; ND — нет данных.

Гены, кодирующие PGP-синтазу (*pgsA*) выявлены у *Rhodobacter sphaeroides* (Dryden, Dowhan, 1996). У *E. coli* существует, по крайней мере, два фермента с PGP-фосфатазной активностью (PgpA, PgpB), которые высвобождают неорганический фосфат из PGP для формирования PG. Инактивация PGP-синтазы является летальной для организма. Многие важные клеточные функции зависят от уменьшения содержания PG и/или CL в мембранах. PG требуется для транслокации белков через мембраны и SecA является ключевым компонентом, влияющим на этот процесс (Kuster et al., 1991), хотя в ряде случаев может происходить SecA-независимая транслокация (Kuster et al., 1994). Кислые фосфолипиды также требуются как для канальной активности бактериальных колицинов A и N, так и для взаимодействия антибиотиков с мембранами (Van der Groot et al., 1993).

VII.C.3. Биосинтез кардиолипина (CL)

CL-синтаза (Cls), вступая в трансэтерификационную реакцию, конденсирует две PG молекулы с получением CL и свободного глицерина (Pluschke et al., 1978). Клетки *E. coli* сохраняют жизнеспособность при инактивации генов *cls*, хотя скорость роста уменьшается по сравнению с соответствующими дикими штаммами, что указывает на роль CL в определении эффективности роста клеток. Накопление CL и активность CL-синтазы возрастают, когда клетки достигают стационарной фазы роста при этом CL становится наиболее стабильным мембранным фосфолипидом. Мутанты, лишённые генов *cls*, теряют жизнеспособность в стационарной фазе, что подтверждает важность CL для длительного сохранения в условиях, не способствующих росту клеток (Hiraoka et al., 1993).

VII.C.4. Биосинтез фосфатидилэтаноламина (PE)

Первый шаг в синтезе PE заключается в катализируемой PS-синтетазой (Pss) конденсации CDP-глицерола с серином с образованием фосфатидилсерины (PS). Второй шаг в образовании PE состоит в катализируемом PS-декарбоксилазой (Psd) декарбоксилировании PS.

По-видимому, для клеток неспособность к синтезу PE является летальной. Удивительно, что эта летальность может фенотипически подавляться добавлением двухвалентных катионов в среде культивирования, хотя это и вызывает изменения функций пермеаз (Bogdanov, Dowhan, 1995), электронного транспорта (Mileykovskaya, Dowhan, 1993), подвижности и хемотаксиса (Shi et al., 1993).

VII.C.5. Биосинтез фосфатидилхолина (PC)

У эукариот фосфатидилхолин (лецитин) является главным фосфолипидом, образующим мембраны. Физиологическое действие фосфатидилхолина хорошо известно (Possmeyer, 1989; Ladd et al., 1993). Однако выяснение молекулярного механизма, в котором может участвовать PC, только начинается.

Биосинтез PC у эукариот также хорошо изучен. PC может синтезироваться как по CDP-холиновому пути, при котором фосфохолин переносится из CDP-холина на диацилглицерол (Kennedy, Weiss, 1956), так и путем метилирования (Vance, Ridgway, 1988). При метилировании PC образуется посредством трех последовательных процессов метилирования фосфатидилэтаноламина и диметил-фосфатидилэтаноламина, с использованием S-аденозил-L-метионина в качестве донора метильных групп.

При изучении функций фосфатидилхолина в бактериях установлено, что *A. tumefaciens* переводят L-[C¹⁴-метил]метионин в липиды, которые при гидролизе дают радиоактивный N-метилэтаноламин, N,N-диметилэтаноламин и холин (Low et al., 1963). Эти результаты были первым указанием на то, что бактерии синтезируют фосфатидилхолин при помощи трансметилирования - пути по которому происходит синтез в микросомальной ферментативной системе печени (Bremer, Greenberg, 1961). Однако случаи выявления фосфатидилхолина у бактерий являются крайне редкими (Goldfine, Ellis, 1964). Никакой ферментативной активности, соответствующей CDP-холиновому пути, у *A. tumefaciens* не было обнаружено (Sheg, Law, 1965), это указывает на то, что метилирование является единственным путем при биосинтезе фосфатидилхолина.

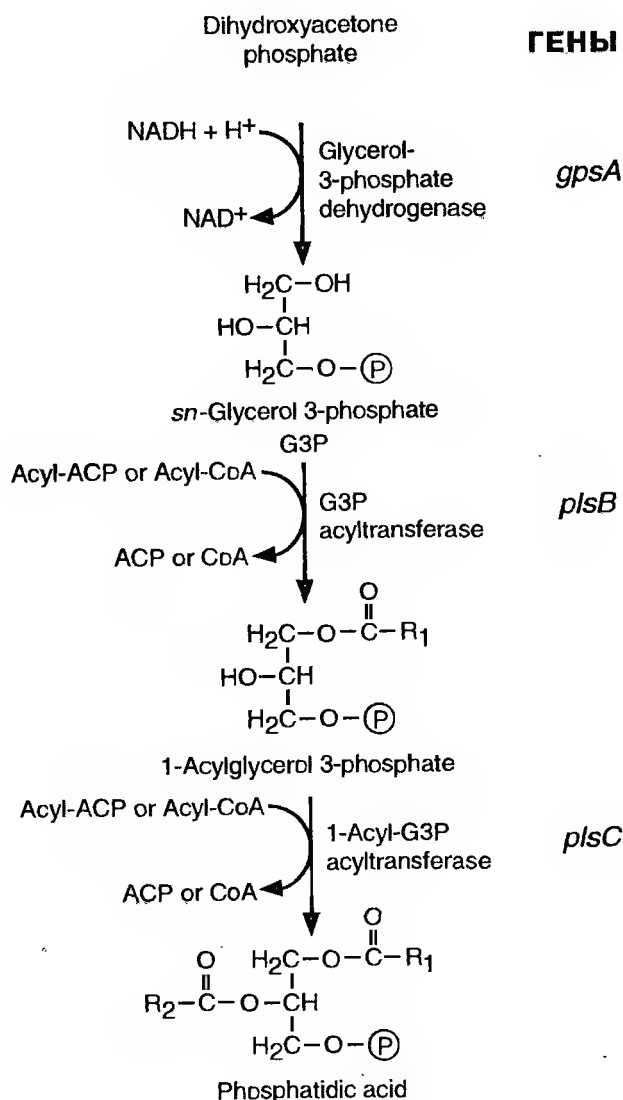


Рисунок 8. Биосинтез фосфатидной кислоты.

Была очищена и охарактеризована фосфатидилэтанолмин-*N*-метилтрансфераза *A. tumefaciens* (Kaneshiro, Law, 1964). Растворимый фермент способен катализировать трансметилирование с образованием всех трех метилированных фосфолипидов, что давало авторам возможность определить существование у *A. tumefaciens* двух независимых ферментов, участвующих в метилировании PE.

Наличие двух ферментов в метаболическом пути биосинтеза PC было также показано в экспериментах с использованием мутантных штаммов *Neurospora* и *Saccharomyces cerevisiae* (Yamashita et al., 1982). Однако у *Zygomonas mobilis* (Tahara et al., 1986, 1987), в метилировании по-видимому, участвует только один фермент, а у *Rhodobacter sphaeroides* существует один структурный ген, кодирующий фосфолипид-*N*-метилтрансферазу, способную катализировать образование всех трех метилированных фосфолипидов (Arondel et al., 1993).

Мутанты, дефицитные по фосфолипид-*N*-метилтрансферазе, получены у *Rhodobacter sphaeroides* (Arondel et al., 1993) и *Zymomonas mobilis* (Tahara et al., 1994). Образование фосфатидилхолина у мутантов не обнаружено. При этом РС-дефицитные мутанты *Rhodobacter* и *Zymomonas* характеризуются нормальным ростом и никаких дополнительных изменений у них обнаружено не было.

Недавно у *S. meliloti* 1021 получены мутанты, дефицитные по фосфолипид-*N*-метилтрансферазе (de Rudder et al., 1997). Эти мутанты дефицитны по моно- и диметилированным производным PE, что указывает на сложность процесса метилирования. Полученные мутанты все же могли синтезировать РС, по-видимому, каким-то неизвестным путем. Ризобии, подобно эукариотам, имеют два метаболические пути образования РС, что косвенно указывает на важную роль РС в жизненном цикле Rhizobiaceae.

VIII. Обмен фосфолипидов

Фосфолипиды могут участвовать в качестве промежуточных продуктов в синтезе других молекул, что мы проиллюстрируем на двух примерах.

VIII.A. ЦИКЛ ДИАЦИЛГЛИЦЕРОЛА

Периплазматические глюканы, так называемые «извлеченные из мембран олигосахариды» (MDO) у *E. coli* или циклические глюканы у Rhizobiaceae, могут замещаться анионными или цвиттерионными остатками. В некоторых случаях эти полярные остатки биосинтетически происходят из головных групп фосфолипидов. Циклические глюканы, замещенные *sn*-1-глицеролфосфатными остатками, у *Agrobacterium* (Miller et al., 1987) или *S. meliloti* получают глицеролфосфатные заместители из фосфатидилглицерола (Miller et al., 1988; Geiger et al., 1991b), и они могут появляться, когда циклические глюканы транспортируются через внутреннюю мембрану (Breedveld et al., 1994). В процессе переноса полярных групп на циклические глюканы, в качестве вторичного продукта образуется диацилглицерол, который должен быть фосфорилирован до фосфатидной кислоты для того, чтобы повторить процесс биосинтеза фосфолипидов. Был клонирован и секвенирован структурный ген диацетилглицерол киназы у *S. meliloti* (Miller et al., 1992).

Циклические β -(1,6)-(1,3)-глюканы у *Bradyrhizobium japonicum* могут быть замещены фосфохолиновым остатком (Rolin et al., 1992). Вероятно, что фосфохолиновая группа переходит из фосфатидилхолина (периплазматические глюканы детально описаны в главе 5).

VIII.B. ЦИКЛ 2-АЦИЛГЛИЦЕРОЛФОСФОЭТАНОЛАМИНА

Синтез главного липопротеина внешней мембраны *E. coli* является сложным процессом. Первичным генным продуктом является фосфолипипропротеин, который содержит 20 остатков N-терминальных сигнальных белков. Затем глицериновый остаток из главной полярной группы PG передается на Cys21 липопротеина, образуя тиоэфир, после чего 2 жирных кислоты этерифицируются до глицерилцистеина. Сигнальные белки удаляются с помощью специфичной эндопептидазы (сигнальная пептидаза II), которая разрывает связи между Gly20 и диацилглицерилцистеином 21 с образованием аполипипропротеина.

Последним шагом в синтезе липопротеина является перенос дополнительной жирной кислоты на вновь образованный N-терминал. Жирная кислота происходит из 1-позиции на PE. Другой конечный продукт 2-ацетилглицеролфосфоэтанолламин рециклируется из ацил-ACP при помощи специфичной ацилтрансферазы (Ass) (Cooper et al., 1989; Hsu et al., 1989; Jackowski et al., 1994).

IX. Регуляция биосинтеза фосфолипидов

При низких концентрациях фосфата калия (примерно 0,1 мМ) в культуральной среде, фосфат лимитирует рост большинства грам-отрицательных бактерий. При этих условиях у *Pseudomonas* и *Rhodobacter* вместо фосфолипидов синтезируются не содержащие фосфат липи-

ГЕНЫ

ГЕНЫ

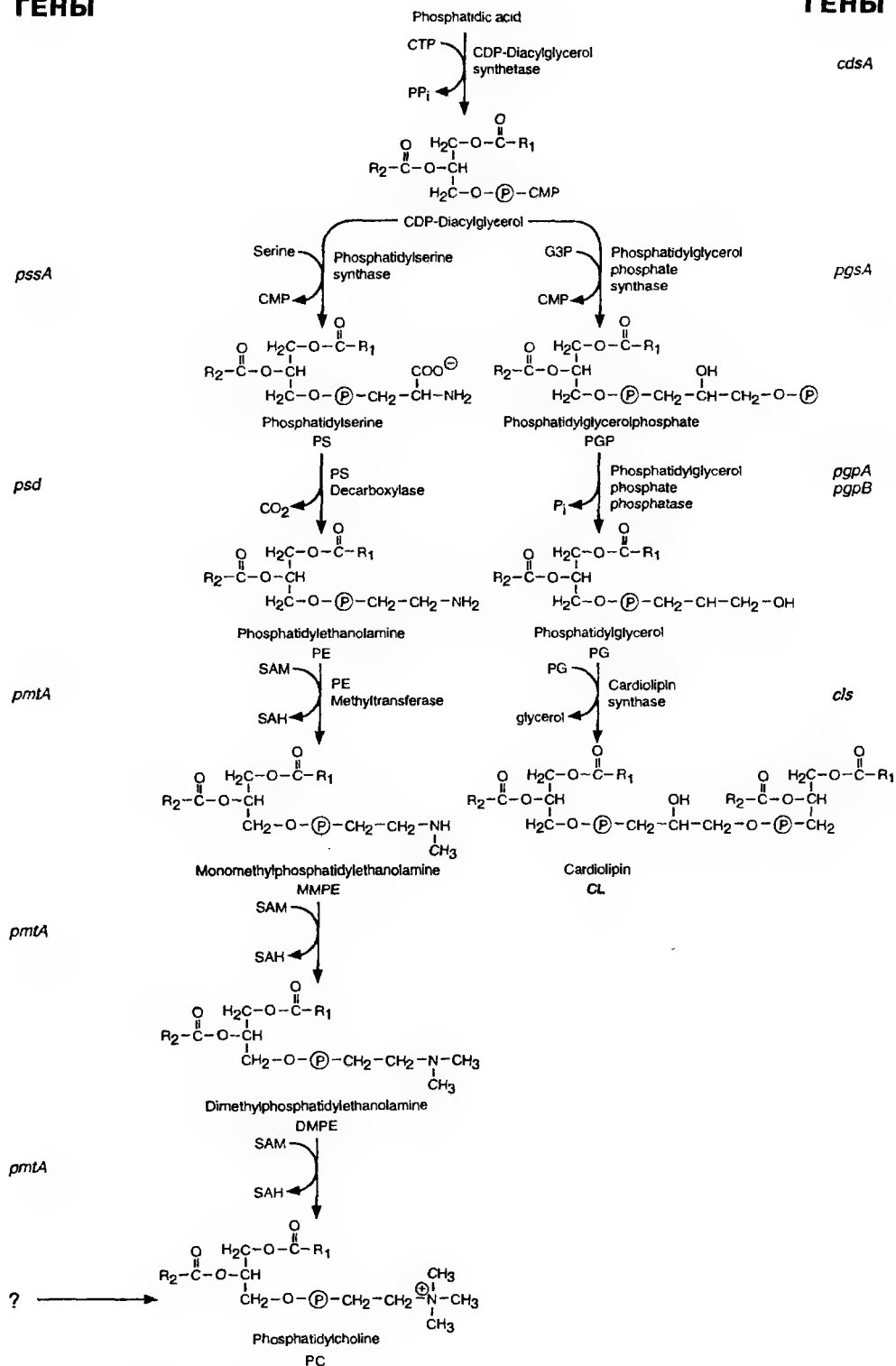


Рисунок 9. Биосинтез фосфолипидов.

ды такие как гликолипиды (глюкозилгалактозил-диацилглицерол и моногексозил-диацилглицерол), сульфолипиды (сульфохиновозил-диацилглицерол), бетаин-содержащие липиды (1,2-ди-*O*-ацил-[4'-(*N*, *N*, *N*-триметил)-гомосерин]глицерол и орнитин-содержащие липиды (Benning et al., 1995). До сих пор не известен молекулярный механизм, контролирующий переключение с биосинтеза фосфолипидов на альтернативный биосинтез липидов, не содержащих фосфор.

Локус *ndvF*, важный для нормального развития клубеньков у *S. meliloti* (Charles et al., 1991), содержит четыре гена *phoCDET*, которые кодируют транспортную систему ABC-типа, необходимую для подачи неорганического фосфата (P_i) (Bardin et al., 1996). Мутанты *ndvF*, не способные поглощать P_i , имели низкую концентрацию цитоплазматического P_i и изучение состава их липидов позволит понять то, как регулируется биосинтез альтернативных безфосфорных липидов у ризобий.

Х. Альтернативные мембранные липиды

Х.А. ГЛИКОЛИПИДЫ

Гликозилдиацилглицеролы - широко распространенные гликолипиды растений, животных и грам-положительных бактерий, но они редко выявляются в грам-отрицательных бактериях. Дигликозилдиацилглицерол (BF-7) отвечает за морфологические изменения корней (образование толстых и коротких корней), деформацию корневых волосков, деление кортикальных клеток у белого клевера - растения-хозяина *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Orgambide et al., 1994). BF-7 выделен из *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (штамм ANU843) и его ковалентная структура определена как 1,2-диацил-3-*O*-(α -D-глюкопиранозил-(1,3)-*O*- α -D-маннопиранозил)-глицерол (рис. 10А). По-видимому, синтез BF-7 зависит от функциональной активности общих *nod*-генов. Однако не существует прямых биохимических доказательств того, что BF-7 конструируется при взаимодействии продуктов *nod*-генов. На основании биохимических функций NodC, NodB и NodA представляется маловероятным, что один из них может участвовать в биосинтезе BF-7. Синтез BF-7 может быть вторичным процессом, начинающимся только после синтеза и накопления зависимых от *nod*-генов липохитоолигосахаридов, которые меняют состав мембран, и вследствие этого вызывают ответную биохимическую реакцию.

Х.В. СУЛЬФОЛИПИДЫ

Сульфолипиды являются неотъемлемой частью мембран фототрофных бактерий, растительных мембран хлоропластов, и они связаны с процессами фотосинтеза. Недавно был получен мутант фототрофной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, дефицитный по синтезу сульфолипидов (Benning, Somerville, 1992a, 1992b; Benning et al., 1993). Эти мутанты не имеют нарушений фотосинтеза и их единственным отличием от исходного штамма была пониженная скорость роста на среде, дефицитной по фосфату (Benning et al., 1993). Лимитирование по фосфату бактерий дикого типа вызывало значительное уменьшение количества всех фосфолипидов и возрастание количества сульфолипидов. Мутанты, дефицитные по сульфолипидам, имели пониженный уровень PC и PE, но обладали нормальным уровнем PG. Кроме того, сульфолипид 6-сульфо-D-сульфохиновозилдиацилглицерол при голодании по фосфату может функционировать в качестве заменителя фосфолипидов, особенно фосфатидилглицерола (Benning et al., 1993). По крайней мере 4 структурных гена (*sqdA*, *sqdB*, *sqdC*, *sqdD*) участвуют в биосинтезе сульфолипидов у *R. sphaeroides* (Benning, Somerville, 1992a, 1992b; Rossak et al., 1995). Исследования с помощью метки [35 S]-сульфата показали, что сульфолипиды присутствуют у *Rhizobium meliloti*, *R. leguminosarum* и *Rhizobium* NGR234, в то время как *Agrobacterium* и *E. coli*, по-видимому, их не содержат (Cedergren, Hollingsworth, 1994; рис. 10В).

Х.Д. ГОПАНОИДНЫЕ ЛИПИДЫ

Гопаноиды – это класс пентациклических тритерпеновых липидов, выявляемых преимущественно у бактерий. Считается, что они образуют группу мембранных стабилизаторов, важных для нормального функционирования бактериальных клеточных мембран. Гопаноиды найдены в большом количестве у грам-отрицательных и грам-положительных бактерий. Они выявлены у азотфиксирующих ассоциативных бактерий *Azotobacter*, *Beijerinckia* и у симбиотических – *Frankia* и *Bradyrhizobium* (Kannenberget al., 1995). Брадиризобии содержат тритерпеноидные гопены диплоптерол, метилированную производную тереофа и сквален, являющихся предшественниками в биосинтезе гопаноидов (рис. 11). Недавно был клонирован ген, кодирующий ключевой фермент биосинтеза гопаноидов – скваленогопен-циклазу (Shc) у *Bradyrhizobium japonicum*. Фермент, полученный при экспрессии гена *shc* в *E. coli*, способен катализировать циклизацию сквалена до гопаноидных производных *in vitro* (Kannenberget al., 1996; Perzel et al., 1996). Некоторые гопаноиды у *Bradyrhizobium* могут составлять до 50% от общей липидной фракции. Однако удивительно, что у представителей рода *Rhizobium* не было зарегистрировано тритерпеноидов (Kannenberget al., 1996).

До сих пор неясна роль гопаноидов у азотфиксирующих организмов. У *Frankia* азотфиксация происходит внутри специализированных внутриклеточных структур – везикул, окруженных ламинированными липидными оболочками, которые, по-видимому, являются барьером для диффузии кислорода. Оболочка состоит главным образом из двух гопаноидных липидов – бактериогопанетерола и фенилацетатного моноэфира, последний из которых является специфичным для везикул (Berry et al., 1993). Гопаноиды у *Bradyrhizobium* могут играть роль в адаптации к микроаэрофильным условиям. Они могут участвовать и в других клеточных адаптационных процессах таких, как адаптация к кислой среде, к которой *Bradyrhizobium* значительно более устойчив, чем *Rhizobium*. Это предположение косвенно подтверждается тем, что количество гопаноидных липидов у термоацидофильных бактерий *Alicyclobacterium* (ранее *Bacillus*) *acidocaldarius* возрастает в ответ на понижение pH среды.

Анализ мутантов *Zymomonas mobilis*, дефицитных по гопаноидам (Tahara et al., 1988), показал пониженную толерантность к высокой концентрации глюкозы. Несомненно, для того, чтобы определить действительную роль гопаноидов у *Bradyrhizobium*, необходимо детальное изучение мутантов, дефицитных по содержанию гопаноидов.

Х.Е. КАРОТИНОИДЫ

Каротиноиды не являются широко распространенными у ризобий, они выявлены у штаммов *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) и ряда нетипичных штаммов, изолированных из *Lotononis bainesii*. Основным каротиноидом у этих штаммов были С30-каротиноидные кислоты, этерифицированные одним или двумя ацетилованными

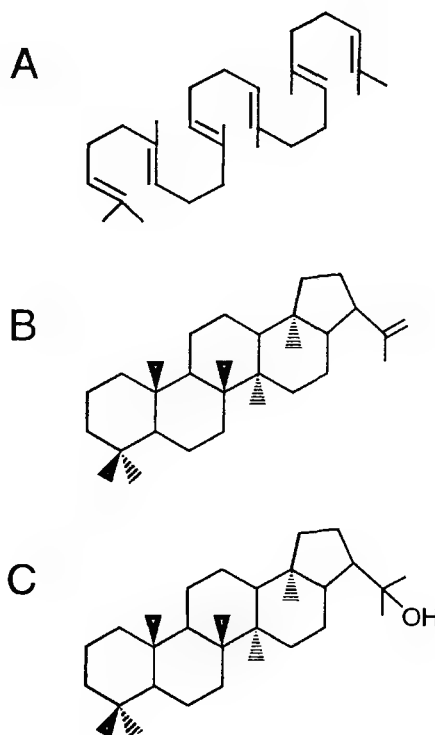


Рисунок 11. Гопаноидные липиды. Тритерпеноиды, идентифицированные у брадиризобий. А – сквален, В – гопен, С – диплоптерол (Kannenberget al., 1995).

ными глюкозными остатками (Kleining, Broughton, 1982). Это же соединение обнаружено у *Pseudomonas rhodos*. Основными пигментами у штаммов *Bradyrhizobium* являлись бициклические С40-каротиноиды, которые являлись гидрокси- и моно-оксо производными β-каротин-ностоксантина (2,3,2',3-ди-транс-тетрагидрокси-β,β'-каротин 44% и 2,3,2',3-ди-транс-тетрагидрокси- β, β'-каротин-4-он 48%) (Kleining et al., 1977). Соответствующие дионы являются основными каротиноидами у мутантов *Bradyrhizobium* (Beyer et al., 1979; рис. 12).

XI. Амфифильные производные жирных кислот

В отличие от мембранных липидов, амфифильные производные жирных кислот, такие как липохитинолигосахариды или *N*-ацилгомосерин лактоны, могут регистрироваться в водной фазе. Концентрация этих молекул достаточна для осуществления ими сигнальных функций (биосинтез липохитинолигосахаридов описан в главе 20).

XI.A. БИОСИНТЕЗ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ - *N*-АЦЕТИЛГОМОСЕРИН ЛАКТОНА

Многие бактерии, включая некоторые фитопатогены, используют феромоны в качестве автоиндукторов, регулирующих экспрессию генов в зависимости от плотности клеточной популяции. Было показано, что автоиндуктором *A. tumefaciens* (AAI) является *N*-(β-кетоктаноил)-L-гомосерин лактон (Zhang et al., 1993). AAI стимулирует конъюгативный перенос Тi-плазмид, кодирующих образование опухолей (Piper et al., 1993). AAI синтезируется с участием белка TraI (Hwang et al., 1994), который кодируется Тi-плазмидой. Очищенный TraI, используя β-кетоктаноил-АСР и *S*-аденозилметионин, продуцирует соответственно β-кетоктаноил и лактон гомосерина, составляющие AAI (More et al., 1996).

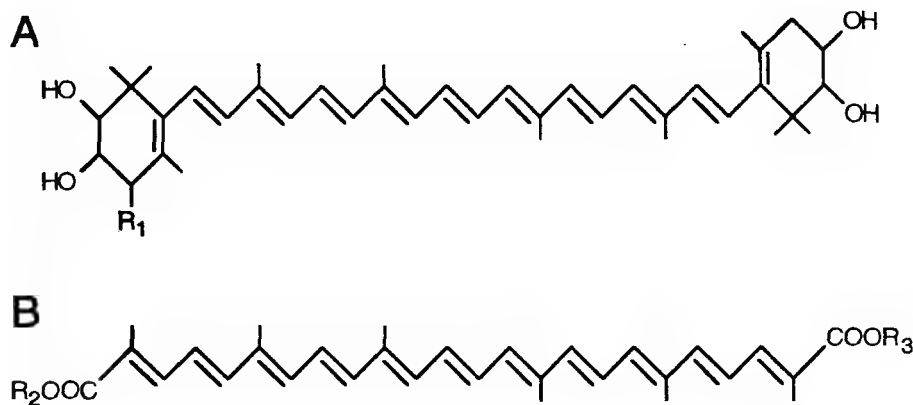


Рисунок 12. Каротиноиды Rhizobiaceae.

А – основной пигмент у *Bradyrhizobium lupini*. R1 = O или R1 = 2H (Kleinig et al., 1977).

В – основной пигмент штаммов ризобий, выделенных из клубеньков *Lotononis bainesii* (Kleinig, Broughton, 1982). R2 = глюкоза (ацилированная жирной кислотой), R3 – H или глюкоза (ацилированная жирной кислотой).

Структурная идентификация бактериоцина из *Rhizobium leguminosarum* позволила выявить новый *N*-(β -D-гидрокси-7-цис-тетрадеценил)-L-гомосерин лактон (Schripsema et al., 1996). Этот аутоиндуктор, по-видимому, вместе с RhiR требуется для активации как оперона *rhiABC*, экспрессируемого в ризосфере, так и для ингибирующей рост функции, кодируемой симбиотической плазмидой pRL111 (Gray et al., 1996). Свойства *N*-ацилгомосерин лактона подробно описаны в главе 10.

XII. Перспективы

Разнообразные сахаридные компоненты (липохитоолигосахариды, экзополисахариды, циклические глюканы, липополисахариды и капсулярные полисахариды) важны для взаимодействия бактерий семейства Rhizobiaceae с растениями-хозяевами. Несмотря на то, что у Rhizobiaceae уже найден обширный спектр мембранных липидных компонентов, многие функциональные свойства этих веществ до сих пор неясны. Бактерии Rhizobiaceae, взаимодействуя с растениями, образуют азотфиксирующие клубеньки или опухоли, и таким образом можно ожидать, что даже небольшие изменения в мембранных белках бактерий будут влиять на эти взаимодействия. Для того, чтобы определить роль отдельных липидных компонентов, необходимо выделение новых мутантов, дефектных по их синтезу и охарактеризованных по способности взаимодействовать с растениями.

XIII. Литература

- Arondel V., Benning C., Somerville C.R. (1993) J. Biol. Chem. V. 268, p. 16002-16008.
Bardin S., Dan S., Osteras M., Finan T.M. (1996) J. Bacteriol. V. 178, p. 4540-4547.
Bell R.M. (1974) J. Bacteriol. V. 117, p. 1065-1076.
Benning C., Beatty J.T., Prince R.C., Somerville C.R. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 90, p. 1561-1565.
Benning C., Huang Z.-H., Gage D.A. (1995) Arch. Biochem. Biophys. V. 317, p. 103-111.
Benning C., Somerville C.R. (1992a) J. Bacteriol. V. 174, p. 2352-2360.
Benning C., Somerville C.R. (1992b) J. Bacteriol. V. 174, p. 6479-6487.
Bergler H., Fuchsichler S., Hogenauer O., Turnowsky F. (1996) Eur. J. Biochem. V. 242, p. 689-694.
Berry A.M., Harriott O.T., Moreau R.A., Osman S.F., Benson D.R., Jones A.D. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 90, p. 6091-6094.
Beyer P., Kleinig H., Englert G., Meister W., Noack K. (1979) Helv. Chim. Acta. V. 62, p. 2551-2557.
Bhat U.R., Carlson R.W., Busch M., Mayer H. (1991a) Int. J. Syst. Bacteriol. V. 41, p. 213-217.
Bhat U.R., Mayer H., Yokota A., Hollingsworth R.I., Carlson R.W. (1991b) J. Bacteriol. V. 173, p. 2155-2159.
Bibb M.J., Biro S., Motamedi H., Collins J.F., Hutchinson C.R. (1989) EMBO J. V. 8, p. 2727-2736.
Bloch K. (1971) β -hydroxydecanoyl thioester dehydrase. In: P.D. Boyer (ed.) The Enzymes, NY, Academic Press, p. 441-464.
Bogdanov M., Dowhan W. (1995) J. Biol. Chem. V. 270, p. 732-739.
Breedveld M.W., Yoo J.S., Reinhold V.N., Miller K.J. (1994) J. Bacteriol. V. 176, p. 1047-1051.
Bremer J., Oreenberg D.M. (1961) Biochim. Biophys. Acta. V. 46, p. 205-216.
Brozek K.A., Carlson R.W., Raetz C.H.R. (1996) J. Biol. Chem. V. 271, p. 32126-32136.
Bunn C.R., Elkan G.H. (1971) Can. J. Microbiol. V. 17, p. 291-295.
Bunn C.R., McNeill J.J., Elkan G.H. (1970) J. Bacteriol. V. 102, p. 24-29.
Cai H., Erhardt P., Troppmair J., Diaz-Meco M.T., Sathanandam O., Rapp U.R., Moscat J., Cooper O.M. (1993) Mol. Cell. Biol. V. 13, p. 7645-7651.
Cane D.E. (1994) Science. V. 263, p. 338-340.
Cedetgren R.A., Hollingsworth R.I. (1994) J. Lipid Res. V. 35, p. 1452-1461.
Charles T.C., Newcomb W., Finan T.M. (1991) J. Bacteriol. V. 173, p. 3981-3992.
Cloutier J., Laberge S., Antoun H. (1997) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 10, p. 401-406.
Collins M.D., Jones D. (1981) Microbiol. Rev. V. 45, p. 316-354.
Colonna-Romano S., Arnold W., Schluter A., Boistard P., Puhler A., Priefer U.B. (1990) Mol. Gen. Genet. V. 223, p. 138-147.
Cooper C.L., Boyce S.G., Lucking D.R. (1987) Biochemistry. V. 26, p. 2740-2746.
Cooper C.L., Hsu L., Jackowski S., Rock C.O. (1989) J. Biol. Chem. V. 264, p. 7384-7389.
Cronan J.E., Rock C.O. (1996) Biosynthesis of membrane lipids. In: F.C. Neidhardt (ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella*, Washington, D.C., ASM Press, p. 612-636.

- Crosby J., Sherman D.H., Bibb M.J., Revill W.P., Hopwood D.A., Simpson T.J. (1995) *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1251, p. 32-42.
- Das P.K., Basu M., Chatterjee G.C. (1979) *J. Gen. Appl. Microbiol.* V. 25, p. 1-9.
- Debelle F., Plazanet C., Roche P., Pujol C., Savagnac A., Rosenberg C., Prome J.C., Denarie J. (1996) *Mol. Microbiol.* V. 22, p. 303-314.
- Debelle F., Sharma S.B. (1986) *Nucleic Acids Res.* V. 14, p. 7453-7471.
- Debelle F., Yang G.P., Ferro M., Truchet G., Prome J.C., Denarie J. (1997) *Rhizobium* nodulation factors in perspective. In: A. Legocki, H. Bothe, A. Puhler (eds.) *Biological fixation of nitrogen for ecology and sustainable agriculture*. Berlin, Heidelberg, NY, Springer, p. 15-23.
- De Hertogh A.A., Mayeux P.A., Evans H.J. (1964) *J. Biol. Chem.* V. 239, p. 2446-2453.
- De Moll E. (1996) Biosynthesis of biotin and lipid acid. In: F.C. Neidhardt (ed.) *Escherichia coli and Salmonella*, Washington, D.C., ASM Press, p. 704-709.
- Demont N., Ardourel M., Maillet F., Prome D., Rerro M., Prome J.C., Denarie J. (1994) *EMBO J.* V. 13, p. 2139-2149.
- Demont N., Debelle F., Aurelle H., Denarie J., Prome J.C. (1993) *J. Biol. Chem.* V. 268, p. 20134-20142.
- De Rudder K.E.E., Thomas-Oates J.E., Geiger O. (1997) *J. Bacteriol.* V. 179, p. 6921-6928.
- Dryden S.C., Dowhan W. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 1030-1038.
- English C.K., Wear D.J., Margileth A.M. (1988) *JAMA.* V. 259, p. 1347-1352.
- Epple G., van der Drift K.G.M., Thomas-Oates J.E., Geiger O. (1997) submitted.
- Faizova G.K., Borodulina Y.S., Samsonova S.P. (1971) *Mikrobiologiya.* V. 40, p. 471-474.
- Firmin J.L., Wilson K.E., Carlson R.W., Davies A.E., Downie J.A. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 10, p. 351-360.
- Froelich J.E., Poorman R., Reardon E., Barnum S.R., Jaworski J.G. (1990) *Eur. J. Biochem.* V. 193, p. 817-825.
- Fuqua C., Winans S.C., Greenberg E.P. (1996) *Annu. Rev. Microbiol.* V. 50, p. 727-751.
- Geiger O., Glushka J., Lugtenberg B.J.J., Spaink H.P., Thomas-Oates J.E. (1997) *Mol. Plant-Microbe Interact.* in press.
- Geiger O., Ritsema T., van Brussel A.A.N., Tak T., Wijffes A.H.M., Bloemberg G.V., Spaink H.P., Lugtenberg B.J.J. (1994a) *Plant and Soil.* V. 161, p. 81-89.
- Geiger O., Spaink H.P., Kennedy E.P. (1991a) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 2872-2878.
- Geiger O., Thomas-Oates J.E., Glushka J., Spaink H.P., Lugtenberg B.J.J. (1994b) *J. Biol. Chem.* V. 269, p. 11090-11097.
- Geiger O., Weissborn A.C., Kennedy E.P. (1991b) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 3021-3024.
- Gerson T., Patel J.J. (1975) *Appl. Microbiol.* V. 30, p. 193-198.
- Gerson T., Patel J.J., Nixon L.N. (1975) *Lipids.* V. 10, p. 134-139.
- Ghose R., Geiger O., Prestegard J.H. (1996) *FEBS Lett.* V. 388, p. 66-72.
- Goldfine H., Ellis M.E. (1964) *J. Bacteriol.* V. 87, p. 8-15.
- Goodridge A.G. (1991) Fatty synthesis in eucaryotes. In: D.E. Vance, J. Vance (eds.) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, Amsterdam, London, NY, Tokyo: Elsevier, p. 111-139.
- Gouill C.L., Desmarais D., Dery C.V. (1993) *Mol. Gen. Genet.* V. 240, p. 146-150.
- Gray K.M., Pearson J.P., Downie J.A., Boboye B.E.A., Greenberg E.P. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 372-376.
- Grogan D.W., Cronan J.E. (1984) *J. Bacteriol.* V. 158, p. 286-295.
- Grogan D.W., Cronan J.E. (1986) *J. Bacteriol.* V. 166, p. 872-877.
- Hale R.S., Jordan K.N., Leadlay P.F. (1987) *FEBS Lett.* V. 224, p. 133-136.
- Heacock P.N., Dowhan W. (1987) *J. Biol. Chem.* V. 262, p. 13044-13049.
- Heath R.J., Rock C.O. (1996) *J. Biol. Chem.* V. 271, p. 27795-27801.
- Hildebrand J.G., Law J.H. (1964) *Biochemistry.* V. 3, p. 1304-1308.
- Hiraoaka S., Matsuzaki H., Shibuya I. (1993) *FEBS Lett.* V. 336, p. 221-224.
- Hej P.B., Svendsen I. (1983) *Carlsberg Res. Commun.* V. 48, p. 285-305.
- Hollingsworth R.I., Carlson R.W. (1989) *J. Biol. Chem.* V. 264, p. 9300-9303.
- Hopwood D.A., Sherman D.H. (1990) *Annu. Rev. Genet.* V. 24, p. 37-66.
- Horvath B., Kondorosi E., John M., Schmidt J., Torok L., Gyorgypal Z., Barabas I., Wiencke U., Schell J., Kondorosi A. (1986) *Cell.* V. 46, p. 335-343.
- Hsu L., Jackowski S., Rock C.O. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 1203-1205.
- Hubac C., Guerrier D., Ferran J., Tremolieres A., Kondorosi A. (1992) *J. Gen. Microbiol.* V. 138, p. 1973-1983.
- Hughes P.E., Tove S.B. (1982) *J. Bacteriol.* V. 151, p. 1397-1402.
- Hwang I., Li P.L., Zhang L., Piper K.R., Cook D.M., Tate M.E., Fan S.K. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 91, p. 4639-4643.
- Issartel J.-P., Koronakis V., Hughes C. (1991) *Nature.* V. 351, p. 759-761.
- Jackowski S., Cronan J.E., Rock C.O. (1991) Lipid metabolism in prokaryotes. In: D.E. Vance, J. Vance (eds.) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, Amsterdam, London, NY, Tokyo: Elsevier, p. 45-85.
- Jackowski S., Jackson P.D., Rock C.O. (1994) *J. Biol. Chem.* V. 269, p. 2921-2928.
- Jarvis B.D.W., Tighe S.W. (1994) *Plant and Soil.* V. 161, p. 31-41.
- Kaneshiro T., Law J.H. (1964) *J. Biol. Chem.* V. 239, p. 1705-1713.
- Kaneshiro T., Marr A.G. (1962) *J. Lipid Res.* V. 3, p. 184-189.
- Kannenberg E.L., Perzl M., Hartner T. (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 127, p. 255-262.
- Kannenberg E.L., Perzl M., Mailer P., Hartner T., Poralla K. (1996) *Plant and Soil.* V. 186, p. 107-112.
- Kennedy E.P., Weiss S.B. (1956) *J. Biol. Chem.* V. 222, p. 193-214.

- Khosia C., Ebert-Khosla S., Hopwood D.A. (1992) Mol. Microbiol. V. 6, p. 3237-3249.
- Khosia C., McDaniel R., Ebert-Khosia S., Torres R., Sherman D.H., Bibb M.J., Hopwood D.A. (1993) J. Bacteriol. V. 175, p. 2197-2204.
- Kiss E., Reuhs B.L., Kim J.S., Kereszt A., Petrovics G., Putnoky P., Dusha I., Carlson R.W., Kondorosi A. (1997) J. Bacteriol. V. 179, p. 2132-2140.
- Kleinig H., Broughton W.J. (1982) Arch. Microbiol. V. 133, p. 164.
- Kleinig H., Heumann W., Meister W., Englert G. (1977) Helv. Chim. Acta. V. 60, p. 254-258.
- Kusters R., Breukink E., Gallusser A., Kuhn A., de Kruijff B. (1994) J. Biol. Chem. V. 269, p. 1560-1563.
- Kusters R., Dowhan W., de Kruijff B. (1991) J. Biol. Chem. V. 266, p. 8659-8662.
- Ladd S.L., Soromer S.A., LaBerge S., Toscano W. (1993) Clin. Neuropharmacol. V. 16, p. 540-549.
- Lambat R.H., Walsh C.T. (1995) J. Biol. Chem. V. 270, p. 24658-24661.
- Law J.H., Zaikin H., Kaneshiro T. (1963) Biochim. Biophys. Acta. V. 70, p. 143-151.
- Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet P., Truchet G., Prome J.-C., Denarie J. (1990) Nature. V. 344, p. 781-784.
- Lowe R.H., Evans H.J. (1962) Soil Sci. V. 94, p. 351-356.
- Lugtenberg B.J.J., Peters R. (1976) Biochim. Biophys. Acta. V. 441, p. 38-47.
- Maagd de R.A., Lugtenberg B.J.J. (1986) J. Bacteriol. V. 167, p. 1083-1085.
- Mac Kenzie S.L., Lapp M.S., Child J.J. (1979) Can. J. Microbiol. V. 25, p. 68-74.
- Manasse R.J., Corpe W.A. (1967) Can. J. Microbiol. V. 13, p. 1591-1603.
- Mileykovskaya E.I., Dowhan W. (1993) J. Biol. Chem. V. 268, p. 24824-24831.
- Miller K.J., Gore R.S., Benesi A.J. (1988) J. Bacteriol. V. 170, p. 4569-4575.
- Miller K.J., McKinstry M.W., Hunt W.P., Nixon B.T. (1992) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 5, p. 363-371.
- Miller K.J., Reinhold V.N., Weissbom A.C., Kennedy E.P. (1987) Biochim. Biophys. Acta. V. 901, p. 112-118.
- Miller K.J., Shon B.C., Oore R.S., Hunt W.P. (1990) Curr. Microbiol. V. 21, p. 205-210.
- Miller R.W., Tremblay P.A. (1983) Can. J. Biochem. Cell Biol. V. 61, p. 1334-1340.
- Morbidoni H.R., de Mendoza D., Cronan J.E. (1996) J. Bacteriol. V. 178, p. 4794-4800.
- More M.I., Finger L.D., Stryker J.L., Fuqua C., Eberhard A., Winans S.C. (1996) Science. V. 272, p. 1655-1658.
- Oliver J.D., Colwell R.R. (1973a) Int. J. Syst. Bacteriol. V. 23, p. 442-458.
- Oliver J.D., Colwell R.R. (1973b) J. Bacteriol. V. 114, p. 897-908.
- Orgambide G.G., Philip-Hollingsworth S., Hollingsworth R.I., Dazzo F.B. (1994) J. Bacteriol. V. 176, p. 4338-4347.
- Perzl M., Mailer P., Poralla K., Kannenberg E.L. (1996) Microbiology. V. 143, p. 1235-1242.
- Petrovics G., Putnoky P., Reuhs B., Kim J., Thorp T.A., Noel K.D., Carlson R.W., Kondorosi A. (1993) Mol. Microbiol. V. 8, p. 1083-1094.
- Piper K.R., Beckvon Bodman S., Farrand S.K. (1993) Nature. V. 362, p. 448-450.
- Platt M.W., Miller K.J., Lane W.S., Kennedy E.P. (1990) J. Bacteriol. V. 172, p. 5440-5444.
- Pluschke O., Hirota Y., Overath P. (1978) J. Biol. Chem. V. 253, p. 5048-5055.
- Possmeyer F. (1989) Metabolism of phosphatidylcholine in lung. In: D.E. Vance (ed.) Phosphatidylcholine metabolism, Boca Raton, Florida: CRC Press, p. 205-224.
- Post-Beittenmiller M.A., Schmid K.M., Ohriogge J.B. (1989) Plant Cell. V. 1, p. 889-899.
- Raetz C.R.H. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 72, p. 2274-2278.
- Randle C.L., Albro P.W., Dittmer J.C. (1969) Biochim. Biophys. Acta. V. 187, p. 214-220.
- Rawlings M., Cronan J.E. (1992) J. Biol. Chem. V. 267, p. 5751-5754.
- Reuhs B.L. (1996) Acidic capsular polysaccharides (K antigens) of *Rhizobium*. In: G. Stacey, B. Mullin, P.M. Gresshoff (eds.) Biology of Plant-Microbe Interactions, St. Paul: International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, p. 331-336.
- Reuhs B.L., Carlson R.W., Kim J.S. (1993) J. Bacteriol. V. 175, p. 3570-3580.
- Revill W.P., Bibb M.J., Hopwood D.A. (1996) J. Bacteriol. V. 178, p. 5660-5667.
- Revill W.P., Leadlay P.F. (1991) J. Bacteriol. V. 173, p. 4379-4385.
- Ritsemä T., Gehring A.M., Stuitje A.R., Dandal I., van der Drift K.M.G.M., Lambat R.H., Walsh C.T., Thomas-Oates J.E., Lugtenberg B.J.J., Spaink H.P. (1997) Mol. Gen. Genet., in press.
- Ritsemä T., Geiger O., van Dillewijn P., Lugtenberg B.J.J., Spaink H.P. (1994) J. Bacteriol. V. 176, p. 7740-7743.
- Ritsemä T., Wijffes A.H.M., Lugtenberg B.J.J., Spaink H.P. (1996) Mol. Gen. Genet. V. 251, p. 44-51.
- Roche P., Maillet F., Plazanet C., Debelles F., Ferro M., Truchet G., Prome J.-C., Denarie J. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 93, p. 15305-15310.
- Rock C.O., Cronan J.E. (1979) J. Biol. Chem. V. 254, p. 9778-9785.
- Rock C.O., Cronan J.E. (1985) Lipid metabolism in prokaryotes. In: D.E. Vance, J.E. Vance (eds.) Biochemistry of lipids and membranes, Menlo Park: The Benjamin/Cummings Publishing Comp., p. 73-115.
- Rolin D.B., Pfeffer P.E., Osman S.F., Szvergold B.S., Kappler F., Benesi A.J. (1992) Biochim. Biophys. Acta. V. 1116, p. 215-225.
- Ronson C.W., Primerose S.B. (1979) J. Gen. Microbiol. V. 112, p. 77-88.
- Rossak M., Tiedje C., Heinz E., Benning C., (1995) J. Biol. Chem. V. 270, p. 25792-25797.
- Schofield P.P., Watson J.M. (1986) Nucl. Acids Res. V. 14, p. 2891-2903.
- Schripsema J., de Rudder K.E.E., van Vliet T.B., Lankhorst P.P., de Vroom E., Kijne J.W., van Brussel A.A.N. (1996) J. Bacteriol. V. 178, p. 366-371.

- Schultze M., Quiclet-Sire B., Kondorosi E., Virelizier H., Glushka J.N., Endre G., Gero S.D., Kondorosi A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 89, p. 192-196.
- Shearman C.A., Rossen L., Johnston A.W.B., Downie J.A. (1986) *EMBO J.* V. 5, p. 647-652.
- Shen Z., Byers D.M. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 571-573.
- Sherman D.H., Malpartida F., Bibb M.J., Kieser H.M., Bibb M.J., Hopwood D.A. (1989) *EMBO J.* V. 8, p. 2717-2725.
- Sherr S.I., Law J. H. (1965) *J. Biol. Chem.* V. 240, p. 3760-3765.
- Shi W., Bogdanov M., Dowhan W., Zusman D.R. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 7711-7714.
- Silbert D.F. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 58, p. 1579-1586.
- Simoni R.D., Criddle R.S., Stumpf P.K. (1967) *J. Biol. Chem.* V. 242, p. 573-581.
- Slabas A.R., Fawcett T. (1992) *Plant Mol. Biol.* V. 19, p. 169-191.
- Souciet G., Weil J.-H. (1992) V. 81, p. 215-225.
- Spaink H.P., Bloemberg G.V., van Brussel A.A.-N., Lugtenberg B.J.J., van der Drift K.M.G.M., Haverkamp J., Thomas-Oates J.E. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 155-164.
- Spaink H.P., Sheeley D.M., van Brussel A.A.N., Glushka J., York W.S., Tak T., Geiger O., Kennedy E.P., Reinhold V.N., Lugtenberg B.J.J. (1991) *Nature*. V. 354, p. 125-130.
- Streit W.R., Joseph C.M., Phillips D.A. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 330-338.
- Tahara Y., Ogawa Y., Sakakibara T., Yamada Y. (1986) *Agric. Biol. Chem.* V. 50, p. 257-259.
- Tahara Y., Ogawa Y., Sakakibara T., Yamada Y. (1987) *Agric. Biol. Chem.* V. 51, p. 1425-1430.
- Tahara Y., Yamada Y., Kondo K. (1976) *Agr. Biol. Chem.* V. 40, p. 1449-1450.
- Tahara Y., Yamashita T., Kondo M., Yamada Y. (1988) *Agric. Biol. Chem.* V. 52, p. 3189-3190.
- Tahara Y., Yamashita T., Sogabe A., Ogawa Y. (1994) *J. Gen. Appl. Microbiol.* V. 40, p. 389-396.
- Therisod H., Kennedy E.P. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 84, p. 8235-8238.
- Therisod H., Weissbom A.C., Kennedy E.P. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 83, p. 7236-7240.
- Thompson E.A., Kaufman A.E., Johnston N.C., Goldfine H. (1983) *Lipids*. V. 18, p. 602-606.
- Van der Groot F.G., Didat N., Pattus P., Dowhan W., Letellier L. (1993) *Eur. J. Biochem.* V. 213, p. 217-221.
- Vance D.E., Ridgway N.D. (1988) *Prog. Lipid Res.* V. 27, p. 61-79.
- Wang A.Y., Cronan J.E. (1994) *Mol. Microbiol.* V. 11, p. 1009-1017.
- Yamada Y., Takinami-Nakamura H., Tahara Y., Oyaizu H., Komagata K. (1982) *J. Gen. Appl. Microbiol.* V. 28, p. 7-12.
- Yamashita S., Oshima A., Nikawa J., Hosaka K. (1982) *Eur. J. Biochem.* V. 128, p. 589-595.
- Zhang L., Minphy P.J., Kerr A., Tate M.E. (1993) *Nature*. V. 362, p. 446-448.

β-глюканы клеточной поверхности

Бридвелд М., Миллер К. Дж.

I.	Введение.....	101
II.	Структурные характеристики циклических β-глюканов.....	101
III.	Локализация циклических β-глюканов.....	103
IV.	Биосинтез циклических β-глюканов.....	104
IV.A.	Генетические локусы, участвующие в биосинтезе циклических β-глюканов.....	104
IV.B.	Белки NdvB/ChvB <i>Rhizobium</i> и <i>Agrobacterium</i> : ассоциированная с мембраной гликозилтрансфераза.....	105
IV.C.	Белки NdvA/ChvA <i>Rhizobium</i> и <i>Agrobacterium</i> , участвующие в транспорте циклических β-(1,2)-глюканов.....	106
IV.D.	Гены <i>ndv</i> у <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	107
IV.E.	Локус <i>cgm</i> у <i>Sinorhizobium meliloti</i>	108
V.	Роль циклических β-глюканов при гипоосмотической адаптации.....	108
V.A.	Свойства циклических β-глюканов, входящих в полисахариды, полученные из мембран <i>Escherichia coli</i>	108
V.B.	Мутанты, дефектные по биосинтезу периплазматических глюканов и по способности к росту в гипоосмотической среде.....	109
V.C.	Осмотическое регулирование биосинтеза циклических β-глюканов.....	109
VI.	Циклические β-глюканы и бактериально-растительные взаимодействия.....	110
VI.A.	Поведение мутантов с отсутствием биосинтеза циклических β-(1,2)-глюканов при инфекции растений-хозяев.....	110
VI.B.	Инфекция и осморегуляция.....	111
VI.C.	Циклические β-глюканы, инфекция и клеточная оболочка.....	111
VI.D.	Могут ли циклические β-глюканы являться сигнальными молекулами при взаимодействии с растениями?.....	112
VI.E.	Почему периплазматические глюканы Rhizobiaceae являются циклическими?.....	113
VII.	Заключительные замечания и перспективы.....	114
VIII.	Благодарности.....	115
IX.	Литература.....	115

I. Введение

Ассоциации ризобий и агробактерий и их растениями-хозяевами являются предметом интенсивного изучения, а углеводы клеточной поверхности этих бактерий, как сейчас выяснено, участвуют в инфекционном процессе. В настоящей главе рассмотрены структурные особенности циклических β-глюканов семейства Rhizobiaceae. В главу включены данные по идентификации и характеристике генетических локусов и ферментных систем, используемых при биосинтезе циклических β-глюканов. В заключение обсуждаются функции этих уникальных молекул в процессе инфекции растений бактериями. Читатель может также обратиться к более раннему обзору по циклическим β-глюканам (Breedveld, Miller, 1994).

II. Структурные характеристики циклических β-глюканов

Циклические β-глюканы, определенные как «полисахариды корончатых галлов», впервые были описаны в культурах *Agrobacterium tumefaciens* (McIntire et al., 1942). С тех пор β-глюканы

найжены у всех изученных штаммов *Agrobacterium*, *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*. У *Agrobacterium* и *Rhizobium* эти молекулы имеют исключительно β -(1,2)-гликозидные связи. Характер связей был доказан при помощи методов метилирования, периодатного окисления и деградации по Смитсу, а β -аномерная конфигурация при С-1 атоме углерода определялась ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопией (Amemura et al., 1983; Dell et al., 1983; Hisamatsu et al., 1983; Breedveld, Miller, 1994). Макроциклические неразветвленные формы первоначально были предложены на основании отсутствия редуцирующих и нередуцирующих концевых групп (Zevenhuizen, Scholten-Koerselman, 1979; York et al., 1980), а затем последовательно подтверждены ^{13}C -ЯМР и масс-спектрометрией при бомбардировке быстрыми атомами (Dell et al., 1983).

Циклические β -(1,2)-глюканы *R. leguminosarum* и *A. tumefaciens* состоят из смеси колец со степенью полимеризации (DP) варьирующей от 17 до 25, в то время как у *S. meliloti* (ранее обозначавшиеся *R. meliloti*) регистрируют более крупные (до DP=40) кольца β -(1,2)-глюканов (Hisamatsu 1992; Breedveld, Miller, 1994). Распределение колец β -(1,2)-глюканов по размерам, по-видимому, зависит от конкуренции между реакциями элонгации и циклизации (Williamson et al., 1992).

Интересно отметить, что никогда не были найдены циклические β -(1,2)-глюканы с DP ниже 17. В подтверждение этого, с помощью методов молекулярного моделирования было предсказано, что конфигурации β -(1,2)-глюканов с DP ниже 17 являются энергетически не выгодными (Palleschi, Crescenzi, 1985; York et al., 1993; York 1995). В модельных исследованиях были также сделаны попытки определить размер плоскости молекул β -(1,2)-глюканов. Один из расчетов показал, что относительно гидрофобная плоскость, которая образует комплексы с гидрофобными внешними молекулами, составляет приблизительно 14 ангстрем в диаметре (Palleschi, Crescenzi, 1985; рис. 1). В результате более позднего расчета (Andre et al., 1995) была предложена несимметричная конфигурация молекулы с маленькой гидрофильной плоскостью (3,7 ангстрем). Показано (Andre et al., 1995), что циклические β -(1,2)-глюканы не могут образовывать комплексы с введенными извне молекулами, хотя имеются сообщения о возможности образования таких комплексов (Koizumi et al., 1984; Okada et al., 1985; Morris et al., 1991).

Штаммы *Bradyrhizobium* синтезируют циклические β -глюканы, содержащие как β -(1,3) так и β -(1,6)-гликозидные связи (Miller et al., 1990). Эти молекулы содержат 10-13 глюкозных остатков и могут формировать разветвленную структуру (Rolin et al., 1992). В этой работе предложена структура циклических β -(1,6)- β -(1,3)-глюканов с DP=13 у *Bradyrhizobium*, которая состояла из цепочки глюкозных остатков, с тремя β -(1,3)-соединенными глюкозными остатками, разделенными тремя β -(1,6)-соединенными глюкозными остатками (Rolin et al., 1992). В модели один остаток присутствовал как ответвление при С-6 у β -(1,3)-связи остатка глюкозы (рис. 1).

Хотя из ранних исследований по циклическим β -(1,2)-глюканам следовало, что это незамещенные, строго нейтральные молекулы, в настоящее время показано, что они могут приобретать заряд при добавлении анионов, таких как *sn* глицерол-1-фосфат, сукцинат, метилмалонат (Breedveld, Miller, 1994). Преобладающим заместителем циклических β -(1,2)-глюканов *S. meliloti* и *A. tumefaciens* является *sn*-глицерол-1-фосфат, который происходит из головной группы фосфатидилглицерина и присоединяется через фосфатную диэфирную связь к глюкозе в позиции С-6 (Miller et al., 1988). Количество заместителей в циклических β -(1,2)-глюканах сильно варьирует у различных штаммов *Agrobacterium* и *Rhizobium*. Обычно во время логарифмического роста клеток большая фракция глюканов содержит 1-4 *sn*-глицерол-1-фосфатных заместителей на одну моносахаридную цепочку, в то время как в стационарной фазе присутствует относительно большее количество нейтральных глюканов (Breedveld, Miller, 1994). Нейтральные формы циклических β -(1,2)-глюканов (Geiger et al., 1991; Breedveld, Miller, 1995) и анионные заместители, добавляемые к их цепочке в периплазматическом пространстве (Breedveld, Miller, 1995) являются предшественниками биосинтеза анионных форм.

Несмотря на тот факт, что циклические β -(1,2)-глюканы *S. meliloti* и *A. tumefaciens* сильно модифицируются анионными заместителями, некоторые ризобии (например, ряд штаммов *R. leguminosarum*), по-видимому, еще способны к добавлению дополнительных заместителей. У штаммов *Bradyrhizobium* циклические β -(1,6)- β -(1,3)-глюканы являются не заряженными и, кроме того, содержат цвиттерийный заместитель фосфохолин, который, вероятно, связан через С-6 с β -(1,3)-соединенными глюкозными остатками (Rolin et al., 1992).

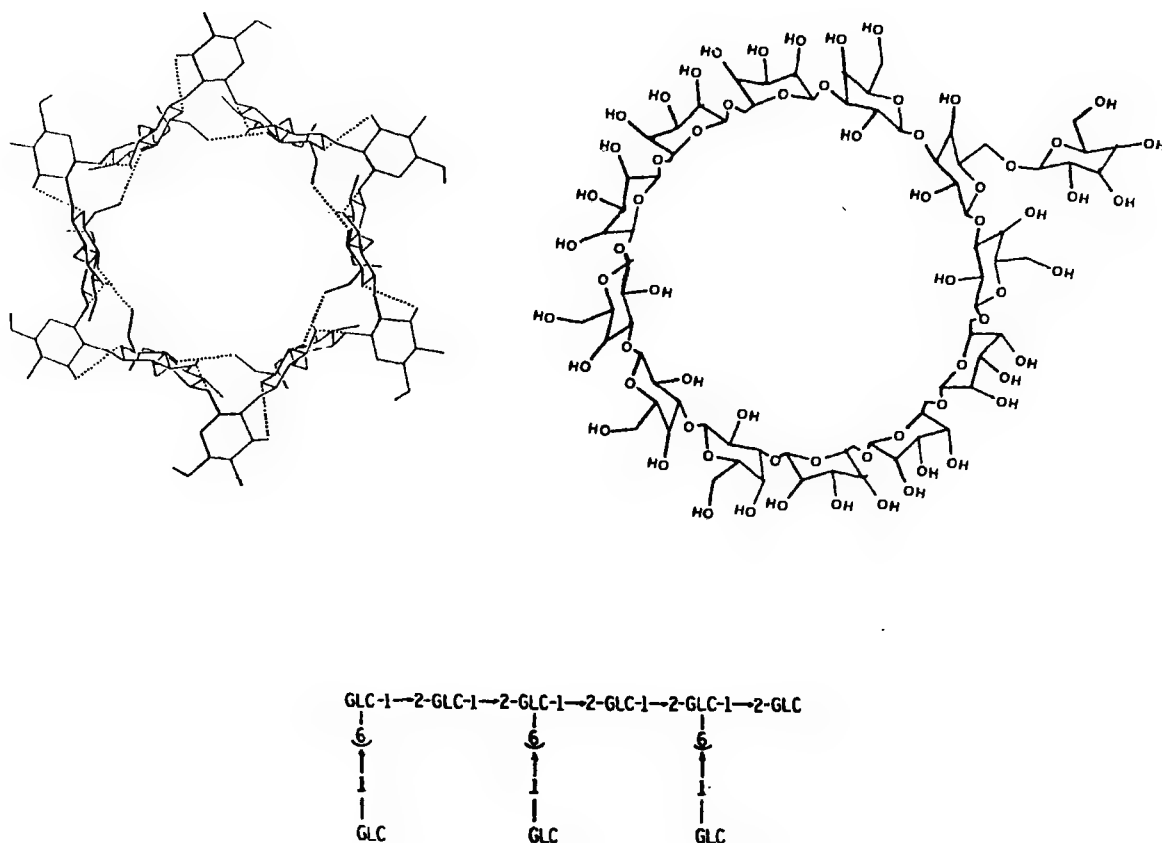


Рисунок 1. Предполагаемая структура циклического β-(1,2)-глюкана с DP=18 (верхняя слева), циклического β-(1,6)-β-(1,3)-глюкана (DP=12) с одним глюкозным остатком, присоединенным β-(1,6)-связью (верхняя справа) и MDO-молекула с 9 глюкозными остатками (внизу). Неуглеводные заместители не показаны.

Можно отметить, что циклические β-глюканы синтезируются и другими бактериями включая *Azospirillum*, *Brucella* и *Xanthomonas* (табл. 1). Интересно, что такие бактерии имеют способность инфицировать различных эукариот, что подтверждает важность циклического характера глюканов при инфицировании.

III. Локализация циклических β-глюканов

Первые исследования циклических β-глюканов *Agrobacterium* и *Rhizobium* фокусировались на анализе сред, в которых выращивались бактерии. Поэтому связанные с клеточной поверхностью β-глюканы не выявлялись. Как сейчас выяснено, в зависимости от штамма и условий культивирования, 5-20% циклических β-(1,2)-глюканов от общей клеточной массы, ассоциировано с клеточной поверхностью, то есть они являются одним из главных клеточных компонентов. Например, концентрация циклических β-(1,2)-глюканов на поверхности клеток *R. leguminosarum* составляет 50-100 мг/г сухой массы клеток и достигает наивысшего уровня в логарифмической стадии роста (Zevenhuizen, 1981). Клеточная концентрация циклических β-(1,2)-глюканов *S. meliloti* несколько

Таблица 1. Хромосомные локусы, участвующие в биосинтезе циклических глюканов

Ген/Локус	Микроорганизм	Размер кодируемого белка (кД)	Функция
<i>ndvA</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	67	экспорт
<i>chvA</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	65	экспорт
<i>ndvB</i>	<i>S. meliloti</i>	319	синтез цепочки
	<i>Rhizobium fredii</i>	?	синтез цепочки
	<i>R. leguminosarum</i>	>319*	синтез цепочки
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	91*	синтез цепочки
<i>ndvC</i>	<i>B. japonicum</i>	62	синтез β -(1,6) связей
<i>chvB</i>	<i>A. tumefaciens</i>	319*	синтез цепочки
<i>cgm</i>	<i>S. meliloti</i>	?	добавление глицеролфосфата

*последовательность генов еще не установлена, размер белков определен методом гель электрофореза

выше (200 мг/г сухой массы клеток) и, по-видимому, остается постоянной в течение логарифмической и стационарной стадий (Zevenhuizen, 1981; Zevenhuizen, Van Neerven, 1983). Клеточная концентрация циклических β -(1,6)- β -(1,3)-глюканов (50 мг/г сухой массы клеток) в культурах *R. japonicum* немного ниже (Miller, Gore, 1992).

Дальнейшие исследования показали, что циклические β -глюканы преимущественно локализованы в периплазматическом пространстве. Предполагая, что относительный периплазматический объем ризобий сходен с таковым для *E. coli* и *S. typhimurium* (Stock et al., 1977), можно оценить, что концентрация циклических β -глюканов в периплазматическом пространстве составляет 10-100 мМ (Breedveld, Miller, 1994; Breedveld et al., 1992). Проведенная оценка диапазона концентрации очень близка к измеряемому пределу растворимости этих молекул, равному 250 г/л, что соответствует диапазону 60-90 мМ для молекул глюкана, содержащих 17-25 глюкозных остатков (Koizumi et al., 1984; Okada et al., 1985).

Присутствие циклических β -глюканов во внеклеточной среде варьирует для различных штаммов и сильно зависит от стадии роста и условий культивирования. Высокий уровень внеклеточных глюканов обычно регистрируется на стационарной фазе роста (Breedveld, Miller, 1994; Geiger et al., 1991; Zevenhuizen 1981; Zevenhuizen, Van Neerven, 1983). Секреция циклических β -(1,2)-глюканов значительно возрастает на определенных средах и при высоких температурах (Breedveld et al., 1990, 1992, 1993).

IV. Биосинтез циклических β -глюканов

IV.A. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЛОКУСЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В БИОСИНТЕЗЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ β -ГЛЮКАНОВ

Мутанты по генам *chvA*, *cvhB* *Agrobacterium* и *chvA*, *cvhB* *S. meliloti* имеют сниженный уровень биосинтеза циклических β -(1,2)-глюканов (Geremia et al., 1987; Stanfield et al., 1988; Cangelosi et al., 1989). Первоначально на хромосоме *Agrobacterium tumefaciens* были идентифицированы гены *chvA*, *cvhB* (Chromosomal Virulence) в составе локуса, необходимого для прикрепления бактерий к растительным клеткам и инфицирования (Douglas et al., 1985). Впоследствии оказалось (Dylan et al., 1986), что *S. meliloti* содержит на хромосоме два локуса (*ndvA* и *ndvB*; Nodule Development), которые участвуют в клубенькообразовании и гомологичны (функционально и структурно) *chvA* и

chvB. Мутации *A. tumefaciens* по локусам *chvA* и *chvB* полностью комплементируются при введении космидных клонов, содержащих *ndvA* и *ndvB* *S. meliloti* (Dylan et al., 1986). Таким образом, исследования по идентификации генетических локусов, участвующих в биосинтезе циклических β -(1,2)-глюканов подтвердили, что эти молекулы функционируют во время инфекции растений. Дальнейший анализ этих локусов показал, что гены *chvA(ndvA)* и *chvB(ndvB)* тесно сцеплены и транскрибируются совместно (Douglas et al., 1985; Dylan et al., 1986). Кроме того, локусы гомологичные *chvA(ndvA)* и/или *chvB(ndvB)* найдены у *R. leguminosarum* (Dylan et al., 1986) и *Azospirillum brasilense* (Raina et al., 1995). Различные исследователи сообщали, что штаммы *Bradyrhizobium* не содержат последовательностей, гомологичных *chvA(ndvA)* или *chvB(ndvB)* (Dylan et al., 1986; Bhagwat, Keister, 1992, 1995; Bhagwat et al., 1993). Однако затем оказалось, что у брадиризобий, инфицирующих *Prosopis*, последовательности, гомологичные *ndvB*, могут быть выявлены при проведении блот-гибридизации в мягких условиях (Thomas et al., 1994).

Недавно были идентифицированы два локуса, участвующие в биосинтезе циклических β -(1,6)- β -(1,3) глюканов и охарактеризованные как *ndvB*-подобный и *ndvC*. Мутанты по этим локусам уменьшали выход обоих циклических β -глюканов и эффективность нодуляции сои (Bhagwat et al., 1996; Dunlap et al., 1996; Pfeffer et al., 1996). У *S. meliloti* идентифицирован локус *cgm* (Cyclic Glucan Modification) (Breedveld et al., 1995). Мутант по этому локусу не способен присоединять *sn*-глицерол-1-фосфат к цепочке циклического β -(1,2) глюкана. Однако в отличие от описанных выше мутантов, *cgm*-мутант способен эффективно инокулировать растения люцерны (Breedveld et al., 1995).

IV.B. БЕЛКИ NDVB/CHVB RHIZOBIUM И AGROBACTERIUM: АССОЦИИРОВАННАЯ С МЕМБРАНОЙ ГЛИКОЗИЛТРАНСФЕРАЗА

Гены *ndvB* у *S. meliloti* и *chvB* у *A. tumefaciens* кодируют высокомолекулярные цитоплазматические мембранные белки, которые участвуют в биосинтезе циклических β -(1,2)-глюканов из УДФ-глюкозы (Zorreguieta, Ugalde, 1986; Geremia et al., 1987; Zorreguieta et al., 1988; Ielpi et al., 1990). На основе анализа их последовательности было предсказано, что ген *ndvB* у *S. meliloti* кодирует биосинтез белка размером 319 кД. Белок NdvB *R. leguminosarum* несколько больше, чем белок NdvB *S. meliloti* (Castro et al., 1995).

Во время биосинтеза циклических β -(1,2)-глюканов белки NdvB и ChvB способны формировать ковалентное промежуточное соединение с глюкановой цепочкой. Этот продукт определяли в анализах *in vitro* с использованием мембран, полученных из клеток *Rhizobium* и *Agrobacterium* при биосинтезе циклических β -(1,2)-глюканов из УДФ-глюкозы (Geremia et al., 1987; Zorreguieta et al., 1985, 1988; Zorreguieta, Ugalde, 1986). Структура нейтральных циклических β -(1,2)-глюканов, синтезированных *in vitro*, была неотличима от продуцируемых *in vivo* (Amemura 1984; Breedveld et al., 1992; Williamson et al., 1992). При дальнейшей очистке циклической β -(1,2)-глюкансинтетазы из мембран *A. radiobacter* были идентифицированы два активных соединения путем их связывания на ионообменной анионной колонке (Kinoshita et al., 1991). Синтетаза I с $M_r=350$ кД показала ту же каталитическую активность, что и неочищенный мембранный препарат. Возможно, что эта активность соответствовала очищенному белку ChvB.

Результаты этих исследований позволяют предположить, что белки NdvB и ChvB участвуют в нескольких стадиях биосинтеза циклических β -(1,2)-глюканов (инициации, элонгации, циклизации). Об этом говорят следующие факты: 1) УДФ-глюкоза служит единственным субстратом и другие олигосахариды или праймеры не нужны для синтеза глюканового кольца (Amemura 1984; Breedveld et al., 1992; Williamson et al., 1992; Zorreguieta et al., 1985). 2) Только циклические формы β -(1,2)-глюканов выявляются после использования препаратов этих белков (Amemura 1984; Breedveld et al., 1992; Williamson et al., 1992; Zorreguieta et al., 1985). 3) Хотя липидоподобные компоненты участвуют в биосинтезе многих других бактериальных полисахаридов, такие компоненты в процессе биосинтеза циклических β -(1,2)-глюканов не детектируются (Breedveld, Miller 1994; Castro et al., 1995). Недавние исследования подтвердили, что *ndvB/chvB*-кодирующая глюкозилтрансфераза ответственна за все стадии биосинтеза цепочки нейтральных циклических β -(1,2)-глюканов. Показано, что растворенный белок внутренних мембран *A. tumefaciens*, разделенный на

нативном белковом геле, способен формировать связанный с белком 319 кДа олигосахаридный компонент *in situ* (Castro et al., 1996). Циклические β -(1,2)-глюканы также образуются после инкубации на геле, содержащем 319 кДа белковый компонент с УДФ-[^{14}C]-глюкозой, а значит, все три ферментативные активности (инициация, элонгация, циклизация), требующиеся для образования циклических β -(1,2)-глюканов, связаны с этими белками.

Было сделано предположение о том (Bhagwat et al., 1992; Ielpi et al., 1990; Zorregueta et al., 1988), что белки NdvB/ChvB имеют домены с более широкими функциями, чем только синтез циклических β -(1,2)-глюканов. Исследования мутантов показали, что до 40% последовательности белков NdvB/ChvB (с карбоксильного конца) не требуется для биосинтеза β -(1,2)-глюканов. Небольшие количества глюканов синтезируются мутантами, утратившими карбоксильный домен. Структурный анализ этих глюканов показал, что они являются смесью циклических молекул с различными размерами и глицерофосфатным составом, сходным с молекулами, образуемыми исходным штаммом (Breedveld et al., 1994).

Показано, что штаммы diaзотрофа *Azospirillum brasilense* имеют генетический локус *svi* (Chromosomal Virulence), для которого NH_2 -домен кодируемого белка имеет значительную гомологию с NH_2 -доменом белка NdvB *S. meliloti* (Raina et al., 1995). Клонированный локус *A. brasilense* может восстанавливать способность мутанта *A. tumefaciens* по гену *chvB* к образованию опухолей на листовых дисках табака (Raina et al., 1995). В ранних работах изучалась глюкозилтрансферазная активность во внутренних мембранах *A. brasilense* и было показано ее функционирование во время биосинтеза β -(1,6)- β -(1,3) глюканов из УДФ-глюкозы (Inon de Iannino, Ugalde, 1993). Получены данные о том, что β -(1,6)- β -(1,3)-глюканы по своему характеру являются циклическими (Bohin, 1996, персональное сообщение). Однако циклические β -(1,2)-глюканы не были зарегистрированы в культурах *A. brasilense*. Эти результаты приводят к выводу о том, что NH_2 -домены белков, включаемые в синтез различных циклических β -глюканов, весьма сходны по структуре.

Эти факты подтверждают данные, полученные при изучении белков NdvB и ChvB *Rhizobium* и *Agrobacterium*, осуществляющих все стадии биосинтеза углеводных цепочек, начинающегося с использования УДФ-глюкозы в качестве субстрата. В ряде работ изучали биосинтез циклических β -(1,2)-глюканов *in vitro*, используя препараты мембран, полученных из клеток *R. leguminosarum*, *S. meliloti*, *A. tumefaciens* и *A. radiobacter* (Amemura, 1984; Zorregueta et al., 1985; Ugalde, 1986; Breedveld et al., 1992; Williamson et al., 1992). Во всех случаях наблюдалась активация синтеза ионами Mn^{2+} или Mg^{2+} . Кроме того, структуры циклических β -(1,2)-глюканов, получаемые *in vitro*, были неотличимы от структур, получаемых *in vivo*.

Биосинтез циклических глюканов *in vitro* изучали также с использованием мембранных препаратов из *B. japonicum* (Cohen, Miller, 1991). Показано, что ионы Mg^{2+} и Mn^{2+} стимулируют активность биосинтеза, однако продукты, синтезируемые *in vitro*, имеют более высокий уровень β -(1,3)-гликозидных связей, по сравнению с синтезом *in vivo* (Miller et al., 1990; Rolin et al., 1992). Предполагается, что продукты, возникающие *in vitro*, содержащие циклические β -(1,2) цепочки состоят из 11 глюкозных остатков с переменным местом ветвления β -(1,6)-глюкозы (Inon de Iannino, Ugalde, 1993). Точки ветвления, по-видимому, служат праймерами при присоединении β -(1,3)-линейных связей. Поскольку структура глюканов брадиризобий более сложна, чем структура циклических β -(1,3)-глюканов, по-видимому, необходимо наличие дополнительных белков, участвующих в их биосинтезе.

IV.C. БЕЛКИ NDVA/CHVA RHIZOBIUM И AGROBACTERIUM, УЧАСТВУЮЩИЕ В ТРАНСПОРТЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ β -(1,2)-ГЛЮКАНОВ

Показано, что гены *ndvA* и *chvA* кодируют соответственно белки с молекулярными массами 67 и 65 кД (Stanfield et al., 1988; Cangelosi et al., 1989; Inon de Iannino, Ugalde, 1989). Эти белки на 76% гомологичны между собой по составу аминокислот, а также гомологичны ABC (ATP Binding Cassette) переносчикам (Palmen et al., 1994). Это семейство белков связывают с разнообразными биологическими процессами, осуществляемыми как у прокариот, так и у эукариот, большинство

из которых включает активный транспорт гидрофильных молекул через цитоплазматические мембраны. Все эти белки содержат домен, состоящий приблизительно из 200 аминокислотных остатков, содержащий АТФ-связывающие сайты. На основе такой гомологии было сделано предположение о том, что белки NdvA и ChvA участвуют в транспорте циклических β -(1,2)-глюканов из периплазмы во внеклеточную среду (Stanfield et al., 1988; Cangelosi et al., 1989). В соответствии с этим предположением, было показано, что выделение циклических β -(1,2)-глюканов во внеклеточную среду сильно ослаблено у мутантов *A. tumefaciens* по гену *chvA* (Inon de Iannino, Ugalde, 1989). Кроме того, мутанты по генам *ndvA* и *chvA* не продуцируют периплазматические глюканы, а аккумулируют циклические глюканы в цитоплазме (Breedveld et al., 1994; Inon de Iannino, Ugalde, 1989). Повторяющаяся олигосахаридная единица экзополисахарида (EPS) *S. meliloti* не была зарегистрирована в супернатанте культуры мутанта по гену *ndvA* (Stanfield et al., 1988). Однако неясно, является ли это явление транспортно-зависимым, так как мутанты также продуцируют много высокомолекулярных EPS. Дальнейший интерес представляет открытие у *S. meliloti* гена *exsA*, который является близким гомологом *ndvA* (Becker et al., 1995). На основании этой гомологии можно предположить, что ExsA и NdvA участвуют в экспорте EPS (Stanfield et al., 1988; Becker et al., 1995). При изучении ассоциированных с клеткой циклических β -(1,2)-глюканов *ndvA*-мутанта *S. meliloti* 102F34 выявлялась смесь циклических глюканов с размерами колец, не отличающимися от дикого типа (Breedveld et al., 1994). Таким образом, гены *ndvA* (*chvA*) не требуются для циклизации цепи β -(1,2)-глюканов. Однако биосинтез анионной формы глюканов резко уменьшается у *ndvA*- и *chvA*-мутантов (Inon de Iannino, Ugalde, 1989; Breedveld et al., 1994). Их неспособность синтезировать анионные формы циклических β -(1,2)-глюканов очевидно происходит из-за нарушений транспорта глюканов в периплазму. Это было показано после добавления в периплазматическое пространство *sn*-глицерол-1-фосфатного и сукцинильного заместителей к цепи глюканов (Breedveld et al., 1995; Breedveld, Miller, 1995).

Энергетика транспорта циклических глюканов через цитоплазматическую мембрану изучена мало. Так как белки NdvA и ChvA не являются истинными АВС-переносчиками можно предположить, что для транспорта необходим дополнительный гидролиз АТФ (Palmen et al., 1994). Исследования по частичному разложению трипсином показали, что NdvA и ChvA могут формировать комплексы с внутренними мембранами *A. tumefaciens* (Inon de Iannino, Ugalde, 1989). Остается определить, участвуют ли эти белки в транспорте циклических β -(1,2)-глюканов из экстрацеллюлярное пространство. Работы с *R. leguminosarum* дают основание предположить, что экспорт из периплазмы во внеклеточную среду не является активным процессом, а находится под влиянием возрастания проницаемости внешних мембран (Breedveld et al., 1992).

IV.D. ГЕНЫ *NDV* У *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

У медленно растущих ризобий сои (*B. japonicum*) выявлен *ndvB*-подобный ген, который участвует в биосинтезе циклических β -(1,6)- β -(1,3)-глюканов (Bhagwat, Keister, 1995). Мутации в этом гене приводят к прекращению биосинтеза циклических глюканов и к неспособности формировать эффективные клубеньки на сое, что подтверждает важность циклических глюканов для симбиоза. Клонированный *ndvB*-подобный ген *B. japonicum* может комплементировать симбиотический *ndvB*-мутант *S. meliloti* (Bhagwat et al., 1993). Неизвестно, содержит ли *ndvB*-подобный локус какую-либо последовательность, гомологическую гену *ndvB* *S. meliloti*, однако гибридизация между *ndvB*-геном *S. meliloti* и геномной ДНК, выделенной из *B. japonicum*, не регистрировалась (Bhagwat, Keister, 1992). Возможно, что *ndvB*-подобный локус *B. japonicum* кодирует 90 кД белок внутренних мембран, который в процессе биосинтеза связывается ковалентно с глюканами брадиризобий (Inon de Iannino, Ugalde, 1993). Это позволяет предположить, что присутствие протеин-связанных компонентов является общим условием биосинтеза циклических β -глюканов.

Недавно у *B. japonicum* идентифицирован второй *ndvB*-локус, участвующий в биосинтезе циклических β -(1,6)- β -(1,3)-глюканов (Bhagwat et al., 1996). Этот локус, названный *ndvC*, очевидно, участвует в синтезе β -(1,6)-связей: мутанты ему синтезируют преимущественно глюканы с β -(1,3) связями. Интересно, что эти мутанты имеют ухудшенное клубенькообразование, слабо зависимое

от осмотических условий роста. Анализ последовательностей показал, что ген *ndvC* кодирует мембранный белок с массой 62 кД.

IV.E. ЛОКУС *CGM* У *SINORHIZOBIUM MELILOTI*

С использованием процедуры тонкослойного хроматографического скрининга были выявлены мутанты *S. meliloti* с пониженным биосинтезом циклических β -(1,2)-глюканов (Breedveld et al., 1995). Анализ 2150 случайно полученных Tn5-клонов позволил выявить один мутант с блокированной способностью перемещать глицерофосфатный заместитель в циклической β -(1,2)-глюкановой цепи. Локус, содержащий вставку Tn5, был назван *cgm* (Cyclic Glucan Modification). Мутант по гену *cgm* синтезировал циклические β -(1,2)-глюканы, лишенные глицерофосфатных заместителей, очевидной компенсацией чего явилось появление большого количества сукцинильных заместителей на цепи циклических β -(1,2)-глюканов. Действительно, общий отрицательный заряд глюканов, синтезируемых *cgm*-мутантами, был сходен с зарядом, характерным для клеток дикого типа. Этот результат предполагает, что ферменты, осуществляющие перенос сукцинильных заместителей на цепь циклического β -(1,2)-глюкана, конкурируют с ферментами, которые определяют перенос *sn*-глицеро-1-фосфатных заместителей. Это согласуется с данными о том, что реакции модификации глюканов происходят в периплазме (Breedveld et al., 1995; Breedveld, Miller, 1995).

V. Роль циклических β -глюканов при гипоосмотической адаптации

V.A. СВОЙСТВА ЦИКЛИЧЕСКИХ β -ГЛЮКАНОВ, ВХОДЯЩИХ В ПОЛИСАХАРИДЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ МЕМБРАН *ESCHERICHIA COLI*

Периплазматические глюканы впервые были открыты у *E. coli*, где они получили название «membrane-derived oligosaccharides» (MDO). MDO содержат β -(1,2)-глюкановую цепь с разветвлениями по β -(1,6)-связям и их размер колеблется от 6 до 13 глюкозных остатков (Kennedy 1996; рис. 1). Кроме того, эти глюканы могут значительно модифицироваться *sn*-глицерол-1-фосфатными, сукцинильными и этаноламинфосфатными заместителями (Kennedy, 1987, 1996). Интересно, что линейные, разветвленные MDO *E. coli* и циклические β -(1,2)-глюканы *S. meliloti* и *A. tumefaciens* содержат *sn* глицерол-1-фосфатные заместители, образующиеся из фосфатидилглицерина (Miller et al., 1987, 1988). К тому же биосинтез MDO у *E. coli* и циклических β -глюканов у большинства форм Rhizobiaceae усиливается при росте в низкоосмотической среде, то есть концентрация этих молекул внутри периплазматической мембраны обеспечивает клеткам защиту от гипоосмотических условий (Breedveld, Miller, 1994; Miller et al., 1986). Однако у нескольких штаммов *R. leguminosarum* и одного штамма *S. meliloti* уровень циклических β -глюканов, ассоциированных с клеткой, не зависел от осмотичности среды (Breedveld et al., 1992; Soto et al., 1992).

Анализ осмотической регуляции биосинтеза периплазматических глюканов для MDO позволил предположить, что анионные глюканы и их контр-ионы образуют осмотически-активный раствор в периплазматическом пространстве, если клетки культивируются в среде с низким осмотическим давлением (Kennedy, 1982). Так как концентрация глюканов во время роста клеток в низкоосмотической среде возрастает до высокого уровня, предполагается, что их аккумуляция может: (1) обеспечивать для клеток механизм регулирования относительного объема периплазматического пространства, (2) приводить к снижению тургорного давления через цитоплазматическую мембрану, (3) привести к эффекту Доннана и возникновению потенциала на поверхностях внешней мембраны. Анионные глюканы могут быть наиболее эффективной формой периплазматического раствора, потому что их противоионы должны также вносить вклад в осмотичность периплазмы. Кроме того, только анионные формы глюканов приводят к возрастанию ионной силы периплазмы и ее емкости, что способствует возникновению Доннановского потенциала на внешней мембране.

V.V. МУТАНТЫ, ДЕФЕКТНЫЕ ПО БИОСИНТЕЗУ ПЕРИПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ГЛЮКАНОВ И ПО СПОСОБНОСТИ К РОСТУ В ГИПООСМОТИЧЕСКОЙ СРЕДЕ

Мутанты по генам *ndvA* и *chvA* у *S. meliloti* и *A. tumefaciens* показывают специфическое снижение интенсивности роста в гипоосмотических средах (Cangelosi et al., 1990; Dylan et al., 1990). Когда в среду культивирования добавляли минеральный раствор, интенсивность роста возрастала до уровня дикого типа (Cangelosi et al., 1990; Dylan et al., 1990). У этих мутантов также наблюдалось изменение поверхностных свойств клеток при росте в среде с низкой осмотичностью. Происходили следующие изменения: (1) потеря подвижности с уменьшением числа жгутиков; (2) повышение устойчивости к некоторым бактериофагам; (3) повышение чувствительности к ряду антибиотиков; (4) возрастание продукции внеклеточных полисахаридов; (5) изменение состава поверхностных белков (Dylan et al., 1986, 1990; Geremia et al., 1987; Cangelosi et al., 1990; Nagpal et al., 1992; Soto et al., 1992). Сходные фенотипы наблюдали у MDO-мутантов *E. coli* (Fiedler, Rotering, 1988; Holtje et al., 1988; Geiger et al., 1992), хотя показано, что *mdoA*-мутанты не снижают интенсивность роста в среде с низкой осмотичностью (Kennedy, 1982). Показано, что изменения клеточных поверхностей, наблюдаемые у *ndv*- и *chv*-мутантов частично супрессируются, если клетки растут в среде с повышенной осмотичностью (Cangelosi et al., 1990; Dylan et al., 1990). Также отмечалось, что мутанты *B. japonicum* по *ndvB*-подобному локусу имеют пониженную подвижность и интенсивность роста в гипоосмотической среде (Bhagwat et al., 1996). Дополнительные доказательства важной роли циклических β -(1,2)-глюканов в гипоосмотической адаптации вытекают из того факта, что после многих попыток изолировать второй сайт «осморевертантов» *ndv*-мутантов *S. meliloti*, были получены ревертанты лишь с частично восстановленной осмотолерантностью (Dylan et al., 1990; Quandt et al., 1992). Еще одно доказательство получено при изучении *exoC*-мутантов *S. meliloti*, которые также утрачивали способность к росту на гипоосмотической среде (Dickstein et al., 1988). Гены *exoC* кодируют фосфоглюкомутазу - фермент, участвующий в биосинтезе УДФ-глюкозы, а *exoC*-мутанты дефектны по биосинтезу EPS, LPS и циклических β -(1,2)-глюканов (Uttaro et al., 1990). Так как других полисахарид-дефектных мутантов, имеющих ухудшенный рост при низкой осмотичности, не выявлено, результаты этой работы подтверждают роль циклических β -(1,2)-глюканов в гипоосмотической адаптации.

Интересно, что *sgm*-мутанты *S. meliloti*, у которых отсутствует способность присоединять *sn*-глицерол-1-фосфат к циклическим глюканам, не теряют способность расти на гипоосмотической среде. Однако глюканы этих мутантов содержат повышенный уровень сукцинильных заместителей, которые влияют на общий анионный заряд молекул, сходный с зарядом клеток дикого типа (Breedveld et al., 1995). Анализ мутантов *B. japonicum* по *ndvC*-локусу показал, что они, как и клетки дикого типа, хорошо растут в гипоосмотической среде. Это может происходить из-за того, что *ndvC* мутанты продуцируют периплазматические глюканы в количестве, сходном с диким типом, хотя структура глюканов не установлена (Bhagwat et al., 1996).

V.C. ОСМОТИЧЕСКОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ БИОСИНТЕЗА ЦИКЛИЧЕСКИХ β -ГЛЮКАНОВ

Биосинтез циклических β -глюканов осмотически регулируется в широком диапазоне у штаммов *Rhizobium*, *Agrobacterium* и *Bradyrhizobium*, что подтверждает ключевую роль этих глюканов в гипоосмотической адаптации. Однако для некоторых штаммов *R. leguminosarum* уровень ассоциированных с клетками циклических β -глюканов не зависит от осмотичности среды (Breedveld et al., 1991). При этом штаммы *R. leguminosarum* выделяют большее количество циклических β -(1,2)-глюканов во время роста на средах с высокой осмотичностью, то есть свойства внешних мембран изменяются под влиянием условий роста (Breedveld et al., 1992). Важно отметить, что изучаемые штаммы *R. leguminosarum* синтезировали нейтральные, незамещенные циклические β -(1,2)-глюканы (Zevenhuizen et al., 1990; Breedveld et al., 1991). Таким образом, возможно, что только анион-

ные формы периплазматических циклических β -(1,2)-глюканов определяют гипоосмотическую адаптацию. Однако циклические β -глюканы штаммов *Bradyrhizobium* (синтез которых подвержен осмотическому регулированию) являются по своему характеру нейтральными и модифицированы цвитерионным заместителем фосфохолином (Tully et al., 1990; Miller, Gore, 1992; Rollin et al., 1992).

Осмотическая регуляция биосинтеза периплазматических глюканов *S. meliloti*, по-видимому, происходит на посттрансляционном уровне, о чем говорят следующие факты: (1) экспрессия *ndvA* и *ndvB* не стимулируется при переносе клеток из высоко- в низкоосмотическую среду (Dylan et al., 1990); (2) *in vitro* активность циклической β -(1,2)-глюкансинтетазы сходна в мембранных препаратах, изолированных из клеток, взятых со сред с низкой и высокой осмотичностью (Zorreguieta et al., 1990); (3) уровень белков NdvB/ChvB сходен для клеток, выращенных на средах с низкой и высокой осмотичностью (Zorreguieta et al., 1990). Очевидно, что активность ферментных систем, участвующих в биосинтезе циклических глюканов, ингибируется при росте клеток на среде с высоким осмотическим давлением. В соответствии с этим было показано, что активность циклической глюкансинтетазы ингибируется при высокой ионной силе раствора *in vitro* (Zorreguieta et al., 1990). Сходные результаты получены для препаратов мембран *R. leguminosarum* (Breedveld et al., 1992) и для биосинтеза MDO *in vitro* (Rumley et al., 1992). Показано, что осмотическое регулирование MDO биосинтеза также происходит на уровне транскрипции (Lacroix et al., 1991).

Изучено влияние осмотичности среды культивирования на перенос *sn*-глицерол-1-фосфатных заместителей на циклические β -(1,2)-глюканы *S. meliloti* (Breedveld, Miller, 1995). Оказалось, что необходимая глицерол-1-фосфаттрансфераза присутствует в клетке, но ее активность ингибируется, когда бактерии растут при повышенной осмотичности.

В дополнение к осмотическому регулированию, биосинтез циклических глюканов ингибируется конечными продуктами (Breedveld et al., 1992). Сходный результат сообщался и для биосинтеза MDO (Rumley et al., 1992). Концентрация циклических β -(1,2)-глюканов, при которой происходит ингибирование, находится в диапазоне их концентрации внутри периплазмы (15 мМ), поэтому ингибирующий эффект может быть физиологически значимым. Можно предположить, что ингибирование конечными продуктами происходит через периплазматический домен белка NdvB. В условиях, при которых внешние мембраны становятся проницаемыми (повышенная температура или высокая осмотичность), постоянная миграция циклических β -(1,2)-глюканов из клетки препятствует ингибированию конечными продуктами и вызывает накопление глюканов во внеклеточной среде (Breedveld et al., 1992).

VI. Циклические β -глюканы и бактериально-растительные взаимодействия

VI.A. ПОВЕДЕНИЕ МУТАНТОВ С ОТСУТСТВИЕМ БИОСИНТЕЗА ЦИКЛИЧЕСКИХ β -(1,2)-ГЛЮКАНОВ ПРИ ИНФЕКЦИИ РАСТЕНИЙ-ХОЗЯЕВ

Установлено, что циклические β -глюканы играют важную роль при инфекции растений-хозяев. Мутанты по генам *ndvA* и *ndvB*, дефектные по синтезу циклических β -(1,2)-глюканов, не присоединяются к растительным клеткам и являются авирулентными (Douglas et al., 1985; Puvanaseraajah et al., 1985). У *S. meliloti* и *R. fredii* *ndvA*- и *ndvB*-мутанты образуют неэффективные псевдо клубеньки на люцерне и сое, соответственно. Из этих псевдо клубеньков, которые содержат небольшое количество инфекционных нитей, abortирующихся на ранних стадиях, не могут быть изолированы бактериоиды (Dylan et al., 1990; Bhagwat et al., 1992). *NdvB*-подобные мутанты *B. japonicum* образуют на сое неэффективные клубеньки, из которых они были выделены (Bhagwat, Keister, 1995).

Дополнительные исследования *ndv*-мутантов *S. meliloti* показали, что сами циклические β -(1,2)-глюканы не важны для нодуляции. Это вытекает из существования псевдоревертантов *ndv*-мутантов, которые позволяют бактериям формировать азотфиксирующие клубеньки даже при отсутствии циклических β -(1,2)-глюканов. Такие псевдоревертанты также часто являются осмочув-

ствительными (Dylan et al., 1990). Однако общее количество инфекционных нитей, образуемых псевдоревертантами, значительно ниже, чем образуемое штаммами дикого типа, и они хуже прикрепляются к клеткам растений (Dylan et al., 1990).

VI.V. ИНФЕКЦИЯ И ОСМОРЕГУЛЯЦИЯ

Можно ожидать, что осмоадаптивная реакция важна в процессе формирования клубеньков, потому что клетки ризобий встречаются с различными осмотическими условиями в ризосфере, в процессе образования инфекционных нитей и симбиосом. Клетки *Agrobacterium* также находятся в различных осмотических условиях в почве, при инфекции растений и в межклеточных пространствах. Поэтому накопление периплазматических циклических β -глюканов может подготавливать бактерии к изменению осмотических условий при инфекции растений. В бактериоидах, выделенных из зрелых клубеньков, в соответствии с непрерывной потребностью периплазматических β -глюканов для нодуляции, наблюдали их высокую концентрацию (Gore, Miller, 1993).

Отсутствие у мутантов по генам *ndv* и *chv* возможности инфицировать растения является косвенным результатом недостатка циклических β -(1,2)-глюканов. Причиной этого может быть неспособность бактерий к осморегуляции, что вызывает отсутствие возможности инфицировать растения. Получены доказательства того, что функции циклических β -(1,2)-глюканов во время нодуляции связаны с осмоадаптивными способностями клеток. Анализ «осморевертантов», полученных у *ndvB*-мутантов *S. meliloti*, показал, что они восстанавливают способность к образованию клубеньков на корнях люцерны, хотя инфекция не приводила к азотфиксации (Quandt et al., 1992).

Как указывалось ранее, у большинства ризобий наиболее интенсивный синтез циклических β -глюканов наблюдается во время роста в гипоосмотической среде, а в высоко осмотической среде их синтез резко снижается. Однако непонятно, почему циклические β -глюканы обнаруживаются в бактериоидах, выделенных из зрелых клубеньков (Gore, Miller, 1993), поскольку образование бактериоидов сопровождается повышением осмотического давления в клубеньках (Botsford, Lewis, 1990). Уровень циклических β -(1,6)- β -(1,3)-глюканов в бактериоидах *B. japonicum*, изолированных из зрелых клубеньков, сходен с их уровнем у свободноживущих культур у бактерий, аэробно растущих на среде с низкой осмотичностью (Gore, Miller, 1992). Возможно, что непрерывный синтез циклических глюканов, продолжаться во время инфекционного процесса, когда бактерии или бактериоиды могут находиться в благоприятных, по сравнению со свободноживущими бактериями, осмотических условиях. Возможно, ризобии внутри клеток растений находятся в условиях более низкой осмотичности, чем предполагалось ранее. Альтернативой может быть то, что биосинтез циклических β -глюканов вне и внутри растения регулируется дифференцировано. Доказательством такой возможности служат данные, полученные при изучении ризобий арахиса (Ghittoni, Bueno, 1995). Биосинтез их циклических глюканов стимулируется при росте на среде с высокой осмотичностью, если в нее добавляют глицинбетаин. Пока неясно, может ли такая стимуляция объяснить непрерывный синтез циклических глюканов во время инфекции. Однако отмечено, что бактериоиды в ответ на высокое осмотическое давление способны аккумулировать различные осмозащитные вещества, такие как глицинбетаин (Fougere, Le Rudulier, 1990), а эти соединения синтезируют многие растения (Wyn Jones, Storey, 1981).

VI.C. ЦИКЛИЧЕСКИЕ β -ГЛЮКАНЫ, ИНФЕКЦИЯ И КЛЕТОЧНАЯ ОБОЛОЧКА

Другим следствием неспособности синтезировать циклические β -глюканы является изменение свойств клеточной оболочки. Плейотропный характер клеточной поверхности *ndv/chv* мутантов (см. выше) предполагает, что аккумуляция циклических β -глюканов внутри периплазматического пространства зависит от общей структуры оболочки. Исследования с мутантами, у которых ослаблена экспрессия гена *ndvB*, показывают, что концентрация циклических β -(1,2)-глюканов в периплазме оказывает сильное влияние на структуру клеточной оболочки. По структуре клеточной поверхности и симбиотическим свойствам такие мутанты занимают промежуточное положение между

“диким типом” и мутантами с усилением экспрессии гена *ndvB* (Breedveld et al., 1994; Ielpi et al., 1990). Как было сказано выше, мутанты с ослабленной экспрессией гена *ndvB* аккумулируют меньше периплазматических β -(1,2)-глюканов, чем клетки дикого типа. На этом основании можно считать, что изменения клеточной оболочки *ndv*- и *chv*- мутантов ответственны за потерю способности к осморегуляции и к инфекции растений.

Существенным доказательством роли циклических β -(1,2)-глюканов при инфекции растений являются исследования, показывающие, что *chvB*-мутанты *A. tumefaciens* теряют способность синтезировать рикадгезин (Smit et al., 1992; Swart et al., 1993, 1994b). Рикадгезин – кальций-связывающий поверхностный белок, который участвует в прикреплении *Agrobacterium* (и других представителей *Rhizobiaceae*) к растительным клеткам (Smit et al., 1992). *chvB*-мутант *A. tumefaciens* активно синтезирует рикадгезин только тогда, когда клетки находятся в среде с повышенной осмотичностью и в присутствии миллимолярных концентраций кальция. При тех же ростовых условиях может восстанавливаться и вирулентность (Swart et al., 1993, 1994a, 1994b). Добавление очищенных циклических β -(1,2)-глюканов к культурам *chvA*- или *chvB*-мутантов *A. tumefaciens* (O’Connell, Handelsman, 1989; Candelosi et al., 1989) не восстанавливает вирулентность, а добавление рикадгезина частично восстанавливает способность к прикреплению и вирулентность. Возможно, что циклические β -(1,2)-глюканы также могут способствовать прикреплению *Rhizobium* и *Agrobacterium* к специфическим сайтам на клеточной поверхности растений. Хотя эти сайты еще не охарактеризованы, проведенные исследования показали, что циклические β -(1,2)-глюканы могут связываться с лектинами гороха (Planque, Kijne, 1976).

VI.D. МОГУТ ЛИ ЦИКЛИЧЕСКИЕ β -ГЛЮКАНЫ ЯВЛЯТЬСЯ СИГНАЛЬНЫМИ МОЛЕКУЛАМИ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С РАСТЕНИЯМИ?

У различных видов *Rhizobium* и *Agrobacterium* распределение размеров колец циклических β -(1,2)-глюканов оказывается очень сходным. Таким образом, маловероятно, что цепочки глюканов определяют специфичность процесса нодуляции. Действительно, различные биотипы *R. leguminosarum* имеют индивидуальную хозяйскую специфичность, но не проявляют существенных различий в структуре глюканов (Breedveld, Miller, 1994). Кроме того, хотя *R. fredii* и *B. japonicum* являются симбионтами сои, они синтезируют резко различающиеся β -(1,2)-глюканы и β -(1,6)- β -(1,3)-глюканы (Bhagwat, Keister, 1992; Miller et al., 1992). Возможно, что не циклический характер, а расположение гликозидных связей определяет важные для симбиоза свойства этих молекул. Кроме того, идентичность заместителей в циклических β -(1,2)-глюканах не может играть решающую роль при определении хозяйской специфичности, так как *R. fredii* продуцирует *sn*-глицерол-1-фосфат-замещенный анионный циклический глюкан, а *B. japonicum* – фосфохолин-замещенный нейтральный циклический глюкан (Bhagwat, Keister, 1992; Rolin et al., 1992). Кроме того, у *S. meliloti* *cgm*-мутант, который не может присоединять *sn*-глицерол-1-фосфатный заместитель к циклическим глюканам, является полностью эффективным симбионтом (Breedveld et al., 1995). Однако эти мутанты продуцируют анионные глюканы, которые содержат повышенный уровень сукцинильных заместителей (Breedveld et al., 1995). Следовательно, общий анионный характер молекул может быть важным для их функций при симбиозе “*S. meliloti*-люцерна”. Дальнейшее указание на важность именно анионных заместителей вытекает из того факта, что в фосфат-лимитированных культурах *S. meliloti* анионные глюканы продуцируются клетками, хотя *sn*-глицерол-1-фосфатные заместители не обнаружены. При этих условиях глюканы сильно модифицированы сукцинатными заместителями (Breedveld et al., 1995).

Возможно, что циклические β -глюканы во время инфекции действуют как сигнальные молекулы. Например, в симбиозе “*S. meliloti*-люцерна” (Bhagwat et al., 1992; Dylan et al., 1990) и “*R. leguminosarum* bv. *trifolii*-клевер” (Abe et al., 1982) добавление очищенных препаратов циклических β -(1,2)-глюканов увеличивает число клубеньков и ускоряет их образование. Однако попытки путем добавления экзогенных циклических β -(1,2)-глюканов восстановить симбиотический фенотип *ndv*-

мутантов *S. meliloti* были неудачными (Dylan et al., 1990). Это показывает, что во время нодуляции важно именно периплазматическое расположение глюканов.

Дополнительное доказательство сигнальной функции вытекает из работ по изучению циклических β -(1,6)- β -(1,3)-глюканов *B. japonicum*, которые имеют общие черты с фрагментами глюканов, выделенных из мицелиальных стенок грибных патогенов сои (Darvill, Albersheim, 1984). Последние являются потенциальными элиситорами синтеза фитоалексина сои. Показано, что глюканы медленно растущих ризобий сои действительно стимулируют синтез изофлавоноидов внутри семян сои (Miller, 1994). Сходные исследования показали, что глюканы медленно растущих ризобий конкурируют с элиситорными фрагментами грибных глюканов за связывание пируватного рецептора у сои (Ebel et al., 1995). Авторы предположили, что глюканы медленно растущих ризобий могут действовать как супрессоры индуцируемого отклика растения. Несмотря на эту важную особенность, *R. fredii* имеют возможность нодулировать сою, не синтезируя циклические β -(1,6)- β -(1,3)-глюканы. Вместо них бактерии синтезируют циклические β -(1,2)-глюканы (Bhagwat et al., 1992).

Недавние исследования (Bhagwat et al., 1996) доказали, что структура циклических β -(1,6)- β -(1,3)-глюканов у *B. japonicum* играет важную роль при нодуляции сои. Мутанты *B. japonicum* по *ndvC*-локусу синтезировали периплазматические β -глюканы на уровне "дикого типа", однако глюканы преимущественно содержали β -(1,3) связи и очень мало β -(1,6) связей. Эти мутанты индуцировали на корнях сои только псевдоклубеньки (Bhagwat et al., 1996).

VI.E. ПОЧЕМУ ПЕРИПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ ГЛЮКАНЫ RHIZOBIACEAE ЯВЛЯЮТСЯ ЦИКЛИЧЕСКИМИ?

Существует несколько возможных преимуществ при синтезе циклических молекул. Например, вероятно, что циклическая цепь более устойчива, чем линейная, к ферментативной деградации. Такое усиление устойчивости может быть важно в ризосферном окружении. Второе возможное преимущество состоит в том, что циклические глюканы используются как селективный резервный материал для Rhizobiaceae, и недоступны для других конкурирующих бактерий в ризосфере. Такая ситуация выявлена у циклодекстрин-продуцирующих бактерий, например, у *Klebsiella oxytoca*. Эти бактерии синтезируют циклодекстраназу, которая позволяет использовать циклодекстрин в качестве резервного материала, недоступного для потребления другими конкурирующими микроорганизмами (Feederle et al., 1996). Циклодекстрины, синтезируемые из крахмала при помощи циклодекстрин глюкозилтрансфераз, являются циклическими глюканами, содержащими от 6 до 8 глюкозных остатков, соединенных по β -(1,4)-глюкозидным связям (Szejtli, 1990). Хотя такая стратегия, по-видимому, возможна и для Rhizobiaceae, нет никаких сообщений о β -глюканазах ризобий, способных гидролизовать циклические β -глюканы. По-видимому, ризобии не способны утилизировать глюканы в качестве источников углерода, фосфора или энергии (Zevenhuizen, 1981; Breedveld et al., 1993; Pfeffer et al., 1994).

Третьим возможным преимуществом циклической структуры глюканов является то, что она позволяет формировать комплексы с гидрофобными молекулами (Koizumi et al., 1984; Okada et al., 1985). Действительно, есть доказательства того, что такие комплексы образуются. Было показано, что растворимость нарингенина (флавоноида, выделяющегося бобовыми растениями) возрастает в присутствии препаратов циклических β -(1,2)-глюканов (Morris et al., 1991). Так как флавоноиды являются индукторами генов нодуляции у различных штаммов *Rhizobium*, образование комплексов между флавоноидами и циклическими β -(1,2)-глюканами может влиять на эффективность нодуляции. Это может объяснить усиление нодуляции, наблюдаемое в том случае, когда препараты циклических β -(1,2)-глюканов добавляются в бобово-ризобиальную систему (Abe et al., 1982; Dylan et al., 1990; Bhagwat et al., 1992). То же было показано для β -циклодекстриновых препаратов (приблизительно 70 мкМ), усиливающих нодуляцию при добавлении в систему "*R. leguminosarum* bv *trifolii*-клевер" (Abe et al., 1982). Необходима дальнейшая проверка возможности образования комплексов, так как неясно, могут ли такие комплексы существовать в естественных условиях (Andre et al., 1995).

Таблица 2. Распространение низкомолекулярных клеточных (периплазматических) β -глюканов у грам-отрицательных бактерий (периплазматическая локализация β -глюканов для некоторых бактерий не подтверждена)

Бактерии	Структура/Связь	DP	Авторы
<i>Acetobacter xylinum</i>	линейная β -(1,2)	6-42	Amemura et al., 1985b; Semino, Dankert, 1993
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	циклическая β -(1,2)	17-25	Amemura, 1984; Kinosyita et al., 1991; Zevenhuizen et al., 1990
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	циклическая β -(1,2)	17-25	Breedveld, Miller, 1994
<i>Alcaligenes</i>	циклическая β -(1,2)		Harada, 1983
<i>Azospirillum brasilense</i> ¹	циклическая β -(1,6)- β -(1,3)	10-13	Bohin, 1996
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	циклическая β -(1,6)- β -(1,3)		Bhagwat, Keister, 1992; Inon de Iannino, Ugalde, 1993; Miller et al., 1990; Rolin et al., 1992
<i>Brucella abortus</i> ²	циклическая β -(1,2)	17-24	Bundel et al., 1988
<i>B. melitensis</i>	циклическая β -(1,2)	17-24	Bundel et al., 1987
<i>Burkholderia solanacearum</i>	циклическая β -(1,2) 1 β -(1,6)-связь	13	Talaga et al., 1996
<i>Erwinia herbicola</i>	линейная β -(1,6)- β -(1,3)		Smith et al., 1995
<i>Escherichia coli</i>	линейная β -(1,6)- β -(1,3)	6-12	Kennedy, 1987
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	линейная β -(1,6)- β -(1,3)		Amemura, Cabrera-Crespo, 1986
<i>Pseudomonas syringae</i>	линейная β -(1,6)- β -(1,3)		Talaga et al., 1994
<i>Rhizobium</i> sp. (<i>Arachis</i>)	" β -глюкан"	20	Ghittioni, Bueno, 1995
<i>Rhizobium</i> (тропический штамм) ³	линейная β -(1,2)	6-19	Amemura et al., 1985a
<i>Rhizobium fredii</i>	циклическая β -(1,2)	17-25	Bhagwat et al., 1992
<i>R. leguminosarum</i>	циклическая β -(1,2)	17-25	Breedveld, Miller, 1994
<i>S. meliloti</i>	циклическая β -(1,2)	17-40	Breedveld, Miller, 1994
<i>Xanthomonas</i> spp. ⁴	циклическая β -(1,2)	16	Talaga et al., 1996
<i>Xanthomonas</i>	линейная β -(1,2)	8-20	Amemura, Cabrera-Crespo, 1986

¹Хотя глюканы были представлены как линейные (Altabe et al., 1994), последние исследования показали, что β -глюканы *Azospirillum brasilense* являются циклическими (Bohin et al., неопубликованные данные).

²Анализ 16S rRNA и состава липида А у *B. abortus* показал тесную филогенетическую связь с *A. tumefaciens* и *S. meliloti* (Moreno et al., 1990).

³Едиственное сообщение, согласно которому периплазматические β -глюканы ризобий не являются циклическими.

⁴*X. oryzae*, *X. phaseoli*, *X. campestris*.

DP - степень полимеризации.

VII. Заключительные замечания и перспективы

Все штаммы *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* и *Agrobacterium* синтезируют периплазматические циклические β -глюканы. Эти глюканы являются основным компонентом клеточной оболочки, который обеспечивает функционирование бактерий как в свободноживущей форме при гипосмоти-

ческой адаптации, так и в процессе инфекции растений. Наилучшее понимание роли циклических β -глюканов достигнуто при изучении *ndv*- и *chv*- мутантов *Rhizobium* и *Agrobacterium*.

Мутанты по локусам *ndv* и *chv* не способны расти в гипосмотической среде и инфицировать растения. Недостаточно ясно, прямо или косвенно действуют ли циклические β -глюканы во время осмотической адаптации или инфекции растений-хозяев, однако аккумуляция циклических β -глюканов в периплазматическом пространстве сильно влияет на общую структуру клеточной оболочки ризобий. Исследования, проведенные с помощью *ndv/chv* мутантов, обнаружили участие белков NdvA/ChvA и NdvB/ChvB в процесс биосинтеза и транспорта цепочек циклических β -(1,2)-глюканов. Недавние исследования позволили выявить ферменты, ответственные за присоединение заместителей к цепочке циклических β -(1,2)-глюканов. Глицерофосфатный и сукцинильный заместители подаются в периплазматическое пространство, где продукт генетического локуса *cgf* определяет, который из них должен включаться в циклические β -(1,2)-глюканы *S. meliloti*. Не известно, существуют ли еще какие-либо белки, участвующие в биосинтезе, модификации и экспорте циклических β -(1,2)-глюканов. Для сравнения можно сказать, что еще меньше известно относительно синтеза циклических β -(1,6)- β -(1,3)-глюканов у *Bradyrhizobium*. Однако недавно выявлены два генетических локуса, включающихся в синтез этих молекул (Bhagwat et al., 1996). Ясно, что будущие усилия должны быть направлены на идентификацию дополнительных генетических локусов, связанных с биосинтезом глюканов у *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* и *Agrobacterium*.

Периплазматические глюканы найдены у ряда грам-отрицательных бактерий (табл. 2), почти все из которых способны инфицировать эукариоты. Это указывает на то, что периплазматические глюканы ризобий и агробактерий играют важную роль во время инфекции растений-хозяев. Интересно, что генетические локусы, которые требуются для синтеза периплазматических β -глюканов у *Pseudomonas syringae*, также важны для возникновения симптомов болезни у растений-хозяев (Loubens et al., 1993). Кроме того, синтез периплазматических глюканов у *P. syringae* является осморегулируемым (Talaga et al., 1994). Дальнейшие исследования необходимы для оценки того, является ли синтез периплазматических β -глюканов общей чертой всех грам-отрицательных бактерий, которые имеют хорошую осморегуляцию и/или вступают в симбиотические (патогенные) взаимоотношения с высшими организмами.

Продолжение синтеза периплазматических β -глюканов в бактериоидах ризобий при развитии клубеньков требует дополнительных объяснений, так как осмотическое давление внутри клубенька, по-видимому, является достаточно высоким для того, чтобы ингибировать синтез глюканов у свободноживущих ризобий. Возможно, что биосинтез циклических β -глюканов в бактериоидах и у свободноживущих бактерий регулируется дифференцировано. Исследования, направленные на изучение биосинтеза периплазматических β -глюканов внутри бактериоидов, могут дать полезные сведения, касающиеся физиологического значения непрерывного синтеза и аккумуляции этих молекул в процессе симбиоза.

VIII. Благодарности

Исследования в лаборатории Карен Миллер поддерживаются грантом MCB-9505706 Национального научного фонда.

IX. Литература

- Abe M., Amemura A., Higashi S. (1982) Plant and Soil. V. 64, p. 315-324.
Altube S.G., Inon-de-Iannino N., de-Mendoza D., Ugalde R.A. (1994) J. Bacteriol. V. 176, p. 4890-4898.
Amemura A. (1984) Agric. Biol. Chem. V. 48, p. 1809-1817.
Amemura A., Cabrera-Crespo J. (1986) J. Gen. Microbiol. V. 132, p. 2443-2452.
Amemura A., Footrakul P., Koizumi K., Utamura T., Taguchi H. (1985a) J. Ferment. Technol. V. 63, p. 115-120.
Amemura A., Hashimoto T., Koizumi K., Utamura T. (1985b) J. Gen. Microbiol. V. 131, p. 301-307.
Amemura A., Hisamatsu M., Mitani H., Garada T. (1983) Carbohydr. Res. V. 114, p. 277-285.
Andre I., Mazeau K., Taravel F.R., Tvaroska I. (1995) Int. J. Biol. Macromol. V. 17, p. 189-198.
Becker A., Kuster H., Niehaus K., Puhler A. (1995) Mol. Gen. Genet. V. 249, p. 487-497.
Bhagwat A.A., Gross K.C., Tully R.E., Keister D.L. (1996) J. Bacteriol. V. 178, p. 4635-4642.

- Bhagwat A.A., Keister D.L. (1992) Can. J. Microbiol. V. 38, p. 510-514.
- Bhagwat A.A., Keister D.L. (1995) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 8, p. 366-370.
- Bhagwat A.A., Tully R.E., Keister D.L. (1992) Mol. Microbiol. V. 6, p. 2159-2165.
- Bhagwat A.A., Tully R.E., Keister D.L. (1993) FEMS Microbiol. Lett. V. 114, p. 139-144.
- Botsford J.L., Lewis T.A. (1990) Appl. Environ. Microbiol. V. 56, p. 488-494.
- Breedveld M.W., Benesi A.J., Marco M.L., Miller K.J. (1995) Appl. Environ. Microbiol. V. 61, p. 1045-1053.
- Breedveld M.W., Dijkema C., Zevenhuizen L.P.T.M., Zehnder A.J.B. (1993) J. Gen. Microbiol. V. 139, p. 3157-3163.
- Breedveld M.W., Hadley J.A., Miller K.J. (1995) J. Bacteriol. V. 177, p. 6346-6351.
- Breedveld M.W., Miller K.J. (1994) Microbiol. Rev. V. 58, p. 145-161.
- Breedveld M.W., Miller K.J. (1995) Microbiology. V. 141, p. 583-588.
- Breedveld M.W., Yoo J.S., Reinhold V.N., Miller K.J. (1994) J. Bacteriol. V. 176, p. 1047-1051.
- Breedveld M.W., Zevenhuizen L.P.T.M., Canter-Cremers H.C.J., Zehnder A.J.B. (1993) Ant. Van Leeuwen. V. 64, p. 1-8.
- Breedveld M.W., Zevenhuizen L.P.T.M., Zehnder A.J.B. (1990) Appl. Environ. Microbiol. V. 56, p. 2080-2086.
- Breedveld M.W., Zevenhuizen L.P.T.M., Zehnder A.J.B. (1991) Arch. Microbiol. V. 156, p. 501-506.
- Breedveld M.W., Zevenhuizen L.P.T.M., Zehnder A.J.B. (1992) J. Bacteriol. V. 174, p. 6336-6342.
- Bundle D.R., Cherwonogrodzky J.W., Perry M.B. (1987) FEBS Lett. V. 216, p. 261-264.
- Bundle D.R., Cherwonogrodzky J.W., Perry M.B. (1988) Infect. Immun. V. 56, p. 1101-1106.
- Cangelosi G.A., Martinetti G., Leigh J.A., Lee C.C., Theines C., Nester E.W. (1989) J. Bacteriol. V. 171, p. 1609-1615.
- Cangelosi G.A., Martinetti G., Nester E.W. (1990) J. Bacteriol. V. 172, p. 2172-2174.
- Castro O.A., Zorreguieta A., Ielmini V., Vega G., Ielpi L. (1996) J. Bacteriol. V. 178, p. 6043-6048.
- Castro O.A., Zorreguieta A., Semino C., Ielpi L. (1995) Arch. Microbiol. V. 163, p. 454-462.
- Cohen J.L., Miller K.J. (1991) J. Bacteriol. V. 173, p. 4271-4276.
- Darvill A.G., Albersheim P. (1984) Annu. Rev. Plant Physiol. V. 35, p. 243-275.
- Dell A., York W.S., McNeill M., Darvill A.G., Albersheim P. (1983) Carbohydr. Res. V. 117, p. 185-200.
- Dickstein R., Bisseling T., Reinhold V.N., Ausubel F.M. (1988) Genes Dev. V. 2, p. 677-687.
- Douglas C.J., Staneloni R.J., Rubin R.A., Nester E.W. (1985) J. Bacteriol. V. 161, p. 850-860.
- Dunlap J., Minami E., Bhagwat A.A., Keister D.L., Stacey G. (1996) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 9, p. 546-555.
- Dylan T., Helinski D.R., Ditta G.S. (1990) J. Bacteriol. V. 172, p. 1400-1408.
- Dylan T., Ielpi L., Stanfield S., Kashyap L., Douglas C., Yanofsky M., Nester E., Helinski D.R., Ditta G. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 83, p. 4403-4407.
- Dylan T., Nagpal P., Helinski D.R., Ditta G.S. (1990) J. Bacteriol. V. 172, p. 1409-1417.
- Ebel J., Bhagwat A.A., Cosio E.G., Feger M., Kissel U., Mithoefer A., Waldmueller T. (1995) Can. J. Bot. V. 73, S506-S510.
- Feederle R., Pajatsch M., Krcmmer E., Bock A. (1996) Arch. Microbiol. V. 165, p. 206-212.
- Fiedler W., Rotering H. (1988) J. Biol. Chem. V. 263, p. 14684-14689.
- Fougere F., Le Rudulier D. (1990) J. Gen. Microbiol. V. 136, p. 157-163.
- Geiger O., Russo F.D., Silhavy T.J., Kennedy E.P. (1992) J. Bacteriol. V. 174, p. 1410-1413.
- Geiger O., Weissborn A.C., Kennedy E.P. (1991) J. Bacteriol. V. 173, p. 3021-3024.
- Geremia R.A., Cavaignac S., Zorreguieta A., Toro N., Olivares J., Ugalde R.A. (1987) J. Bacteriol. V. 169, p. 880-884.
- Ghittoni N.E., Bueno M.A. (1995) Can. J. Microbiol. V. 41, p. 1021-1030.
- Gore R.S., Miller K.J. (1992) J. Bacteriol. V. 174, p. 7838-7840.
- Gore R.S., Miller K.J. (1993) Plant Physiology. V. 102, p. 191-194.
- Harada T. (1983) Biochem. Soc. Symp. V. 48, p. 97-116.
- Hisamatsu M. (1992) Carbohydr. Res. V. 231, p. 137-146.
- Hisamatsu M., Amemura A., Koizumi K., Utamura T., Okada Y. (1983) Carbohydr. Res. V. 121, p. 31-40.
- Holtje J.V., Fiedler W., Rotering H., Walderich B., van-Duin J. (1988) J. Biol. Chem. V. 263, p. 3539-3541.
- Ielpi L., Dylan T., Ditta G.S., Helinski D.R., Stanfield S.W. (1990) J. Biol. Chem. V. 265, p. 2843-2851.
- Inon De Iannino N., Briones G., Tolmasky M.E., Ugalde R.A. (1996) ASM Annual Meeting, H-137.
- Inon De Iannino N., Ugalde R.A. (1989) J. Bacteriol. V. 171, p. 2842-2849.
- Inon De Iannino N., Ugalde R.A. (1993) Arch. Microbiol. V. 159, p. 30-38.
- Kennedy E.P. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 79, p. 1092-1095.
- Kennedy E.P. (1987) Membrane-derived oligosaccharides. In: F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, H.E. Umbarger (Ed) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, cellular and molecular biology, V. 1 Amer. Soc. Microbiol. Washington, D.C.
- Kennedy E.P. (1996) Membrane-derived oligosaccharides (periplasmic beta-D-glucans) of *Escherichia coli*. In: F.C. Neidhardt, R. Curtis, J.L. Ingraham, C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger (Ed) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, cellular and molecular biology, V. 1 Amer. Soc. Microbiol. Washington, D.C.
- Kinoshita S., Nakata M., Amaemura A., Taguchi H. (1991) J. Ferment. Bioeng. V. 72, p. 416-421.
- Koizumi K., Okada Y., Horiyama S., Utamura T., Higashiura T., Ikeda M. (1984) J. Inclusion Phenom. V. 2, p. 891-899.
- Lacroix J.M., Loubens I., Tempete M., Menichi B., Bohin J.P. (1991) Mol. Microbiol. V. 5, p. 1745-1753.
- Loubens I., Debarbieux L., Bohin A., Lacroix J.M., Bohin J.P. (1993) Mol. Microbiol. V. 10, p. 329-340.

- McFature F.C., Peterson W.H., Riker A.J. (1942) *J. Biol. Chem.* V. 143, p. 491-496.
- Miller K.J., Gore R.S. (1992) *Curr. Microbiol.* V. 24, p. 101-104.
- Miller K.J., Gore R.S., Benesi A.J. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 4569-4575.
- Miller K.J., Gore R.S., Johnson R., Benesi A.J., Reinhold V.N. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 136-142.
- Miller K.J., Hadley J.A., Gustine D.L. (1994) *Plant Physiology.* V. 104, p. 917-923.
- Miller K.J., Kennedy E.P., Reinhold V.N. (1986) *Science.* V. 231, p. 48-51.
- Miller K.J., Reinhold V.N., Weissbom A.C., Kennedy E.P. (1987) *Biochim. Biophys. Acta.* V. 901, p. 112-118.
- Moreno E., Stackebrandt E., Dorsch M., Wolters J., Busch M., Mayer H. (1990) *J. Bacteriol.* 172, 3569-3576.
- Morris V.J., Brownsey G.J., Chilvers G.R., Harris J.E., Gunning A.P., Stevens B.H.J. (1991) *Food Hydrocoll.* V. 5, p. 185-188.
- Nagpal P., Khanuja S.P., Stanfield S.W. (1992) *Mol. Microbiol.* V. 6, p. 479-488.
- O'Connell K.P., Handelsman J. (1989) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 2, p. 11-16.
- Okada Y., Horiyama S., Koizumi K. (1985) *Yakugaku Zasshi.* V. 106, p. 240-247.
- Palleschi A., Crescenzi V. (1985) *Gazz. Chim. Ital.* V. 115, p. 243-245.
- Palmer R., Driessen A.J.M., Hellingwerf K.J. (1994) *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1183, p. 417-451.
- Pfeffer P.E., Becard G., Rolin D.B., Uknalis J., Cooke P., Tu S. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 60, p. 2137-2146.
- Pfeffer P.E., Osman S.F., Hotchkiss A., Bhagwat A.A., Keister D.L., Valentine K.M. (1996) *Carbohydr. Res.* V. 296, p. 23-37.
- Planque K., Kijne J.W. (1976) *FEBS Lett.* V. 73, p. 64-66.
- Puvanaserajah V., Schell P.M., Stacey O., Douglas C.J., Nester E.W. (1985) *J. Bacteriol.* V. 164, p. 102-106.
- Quandt J., Hillemann J., Niehaus K., Arnold W., Puhler A. (1992) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 5, p. 420-427.
- Raina S., Raina R., Venkatesh T.V., Das H.K. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 322-326.
- Rolin D.B., Pfeffer P.E., Osman S.F., Szewigold S., Kappler F., Benesi A.J. (1992) *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1116, p. 215-225.
- Rumley M.K., Therisod H., Weissbom A.C., Kennedy E.P. (1992) *J. Biol. Chem.* V. 267, p. 11806-11810.
- Semino C.E., Dankert M.A. (1993) *J. Gen. Microbiol.* V. 139, p. 2745-2756.
- Smit G., Swart S., Lugtenberg B.J., Kijne J.W. (1992) *Mol. Microbiol.* V. 6, p. 2897-2903.
- Smith A.R.W., Rastall R.A., Blake P., Hignett R.C. (1995) *Microbios.* V. 83, p. 27-39.
- Soto M.J., Lepek V., Lopez L.I.M., Olivares J., Toro N. (1992) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 5, p. 288-293.
- Stanfield S.W., Ielpi L., O'Brochta D., Helinski D.R., Ditta G.S. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 3523-3530.
- Stock J.B., Rauch B., Roseman S. (1977) *J. Biol. Chem.* V. 252, p. 7850-7861.
- Swart S., Logman T.J.J., Lugtenberg B.J.J., Smit G., Kijne J.W. (1994a) *Arch. Microbiol.* V. 161, p. 310-315.
- Swart S., Lugtenberg B.J.J., Smit G., Kijne J.W. (1994b) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 3816-3819.
- Swart S., Smit G., Lugtenberg B.J.J., Kijne J.W. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 10, p. 597-605.
- Szejtli J. (1990) *Carbohydr. Polym.* V. 12, p. 375-392.
- Talaga P., Fournet B., Bohin J.P. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 6538-6544.
- Talaga P., Stahl B., Wieruszkeski J.M., Hillenkamp F., Tsuyumu S., Lippens G., Bohin J.P. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 2263-2271.
- Thomas P.M., Golly K.F., Zyskind J.W., Virginia R.A. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 60, p. 1146-1153.
- Tully R.E., Keister D.L., Gross K.C. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 56, p. 1518-1522.
- Uttaro A.D., Cangelosi G.A., Geremia R.A., Nester E.W., Ugalde R.A. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 1640-1646.
- Williamson O., Damani K., Devenney P., Faulds C.B., Morris V.J., Stevens B.J. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 7941-7947.
- Wyn Jones R.G., Storey R. (1981) *Betaines*. In: L.G. Paleg, D. Aspinall (Ed) *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. Acad. Press, New York, p. 171-204.
- York W.S. (1995) *Carbohydr. Res.* V. 278, p. 205-225.
- York W.S., McNeil M., Darvill A.G., Albersheim P. (1980) *J. Bacteriol.* V. 142, p. 243-248.
- York W.S., Thomson J.U., Meyer B. (1993) *Carbohydr. Res.* V. 248, p. 55-80.
- Zevenhuizen L.P.T.M. (1981) *Ant. Van Leeuwen.* V. 47, p. 481-497.
- Zevenhuizen L.P.T.M., Scholten-Koerselman H.J. (1979) *Ant. Van Leeuwen.* V. 45, p. 165-175.
- Zevenhuizen L.P.T.M., van-Veldhuizen A., Fokkens R.H. (1990) *Ant. Van Leeuwen.* V. 57, p. 173-178.
- Zevenhuizen L.P.T.M., Van Neerven A.R.W. (1983) *Carbohydr. Res.* V. 118, p. 127-134.
- Zorreguieta A., Cavaignac S., Geremia R.A., Ugalde R.A. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 4701-4704.
- Zorreguieta A., Geremia R.A., Cavaignac S., Cangelosi G.A., Nester E.W., Ugalde R.A. (1988) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 1, p. 121-127.
- Zorreguieta A., Tolmasky M.E., Staneloni R.J. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* V. 238, p. 368-372.
- Zorreguieta A., Ugalde R.A. (1986) *J. Bacteriol.* V. 167, p. 947-951.
- Zorreguieta A., Ugalde R.A., Leioir L.F. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 126, p. 352-357.

Синтез экзополисахаридов

Беккер А., Пюлер А.

I.	Введение.....	119
II.	Принципы структуры и биосинтеза экзополисахаридов ризобий.....	120
	II.A. Структура.....	120
	II.B. Биосинтез.....	120
	II.C. Примеры.....	122
III.	Генетика биосинтеза экзополисахаридов ризобий.....	124
	III.A. Организация генных кластеров.....	124
	III.A.1. Кластер <i>exo/exs</i> у штамма SU47 <i>S. meliloti</i> , контролирующий биосинтез ЭПС-1.....	124
	III.A.2. Кластер <i>exp</i> -генов штамма SU47 <i>S. meliloti</i> , контролирующий биосинтез ЭПС-2.....	125
	III.A.3. Гомологи <i>exo</i> -генов штамма SU47 <i>S. meliloti</i> , присутствующие у других бактерий.....	125
	III.B. Регуляция синтеза экзополисахаридов.....	127
	III.B.1. <i>S. meliloti</i>	128
	III.B.2. <i>Rhizobium</i> sp. (штамм NGR234) и <i>R. leguminosarum</i>	130
	III.C. Биосинтез экзополисахаридов у штамма SU47 <i>S. meliloti</i>	131
	III.C.1. ЭПС-1.....	132
	III.C.2. ЭПС-2.....	134
IV.	Функции экзополисахаридов ризобий в свободноживущем состоянии и их роль в образовании клубеньков.....	134
	IV.A. Осмопротекция.....	134
	IV.B. Образование клубеньков (штамм SU47 <i>S. meliloti</i>).....	135
	IV.B.1. Симбиотические свойства мутантов, дефектных по ЭПС.....	135
	IV.B.2. Роль ЭПС-1 и ЭПС-2 в инвазии клубеньков люцерны.....	136
V.	Заключение и перспективы.....	137
VI.	Литература.....	138

I. Введение

Многие бактерии, включая Rhizobiaceae, могут синтезировать экзополисахариды. Полимеры сахаров, образующие оболочку на наружной стороне клеток, называют капсульными полисахаридами (КПС), тогда как термин экзополисахариды (ЭПС) используют для макромолекул, слабо связанных с клеткой. Благодаря варьированию моносахаридных последовательностей, конденсационным связям и неуглеводным замещениям, эти макромолекулы очень разнообразны. Их биологические свойства зависят от структуры и молекулярной массы. Эти свойства, а также локализация ЭПС, образующего внешний слой на клеточной поверхности, играют важную роль в защите клеток от влияния среды, а также в питании и проявлении антигенных свойств (Costerton et al., 1987; Sutherland, 1988; Whitfield, 1988; Beveridge, Graham, 1991). Структурное разнообразие олигосахаридов, составляющих ЭПС, позволяет им функционировать также как сигнальным молекулам в клеточных взаимодействиях. И наконец, у многих симбиотических бактерий сем. Rhizobiaceae олигосахариды играют важную роль во взаимодействиях с растениями-хозяевами.

В этом обзоре будут рассмотрены молекулярные механизмы биосинтеза и функционирования ЭПС ризобий. Мы рассмотрим генетические и биохимические подходы для изучения ЭПС главным образом *Sinorhizobium meliloti* (ранее — *Rhizobium meliloti*) как наиболее подробно охарактеризованной в этом отношении бактерии. В сравнительном плане будет рассматриваться синтез ЭПС и у других ризобий.

II. Принципы структуры и биосинтеза экзополисахаридов ризобий

Несмотря на большое структурное разнообразие ЭПС, могут быть сформулированы общие принципы, характеризующие их структуру и биосинтез.

II.A. СТРУКТУРА

ЭПС бактерий — это либо гомополимеры, состоящие из одинаковых остатков сахара, либо гетерополимеры, содержащие несколько разных остатков. Углеводные компоненты, выявляемые в ЭПС ризобий, представляют собой в основном моносахариды такие как D-глюкоза, D-галактоза, D-манноза, D-глюкуроновая кислота и D-галактуриновая кислота. Неуглеводные заместители обычно представлены О-ацетильными группами, а также кето-связанными пируватными и сукцинильными полуэфирными группами. Реже встречаются гидроксibuтанол, пропионил и глицерол. В дополнение к уоновым кислотам, в состав ризобияльных ЭПС входят отрицательно заряженные радикалы, которые определяют их кислую реакцию. Регулярная структура гетерополисахаридов определяется наличием повторяющихся единиц. В дополнение к линейным полимерам ЭПС, идентифицированы и молекулы с разветвленными цепями.

II.B. БИОСИНТЕЗ

Биосинтез ЭПС включает ряд последовательных стадий. Нуклеотид-дифосфосахариды представляют собой активированные сахара, служащие предшественниками для образования полисахаридов (Shibaev, 1986). Описаны различные способы их биосинтеза. Последовательный перенос сахаров на растущую полисахаридную цепь, присоединенную к акцептору, описан для многих гомополимеров. Этот способ полимеризации приводит к образованию полисахаридной цепи, растущей с нередуцирующего конца (рис. 1). КПС группы II, состоящие из салициловой кислоты у штаммов K1 и K5 *E. coli* (Rohr, Troy, 1980; Finke et al., 1991) и маннанового О-полисахарида штамма O9 *E. coli* (Kido et al., 1995) являются примерами такого механизма полимеризации. Фосфатная группа является акцептором полимеризации для большинства гомополимеров, хотя иногда, например в случае синтеза КПС у штамма K5 *E. coli*, не получено данных о существовании связанного промежуточного продукта (Finke et al., 1991). Поскольку были идентифицированы белки, связанные с редуцирующим концом КПС штамма K1 *E. coli* (Weisgerber, Troy, 1990) и присоединенные к промежуточным продуктам биосинтеза β-глюканов у ряда бактерий (Breedveld, Miller, 1994), можно обсуждать роль подобных белков как потенциальных акцепторов при полимеризации полисахаридов.

Второй способ биосинтеза включает формирование промежуточных продуктов, которые последовательно полимеризуются блоками, что приводит к образованию гетерополисахаридов, состоящих из повторяющихся единиц. Перенос растущего липид-связанного полимера на нередуцирующий конец мономерного липид-связанного предшественника приводит к образованию полимерной цепи, растущей на редуцирующем конце (рис. 1). Интенсивно изучаемым примером этого механизма явился биосинтез ксантана *Xanthomonas campestris* (Capage et al., 1987; Coplin, Cook, 1990; Ielpi et al., 1993).

В противоположность участию липид-связанных промежуточных продуктов, получены примеры независимого от акцептора способа полимеризации. Биосинтез целлюлозы у *Acetobacter xylinum* осуществляется синтазой целлюлозы, которая остается связанной с ферментом во время полимеризации (Valla et al., 1989; Wong et al., 1990). Синтаза целлюлозы, возможно, локализована во

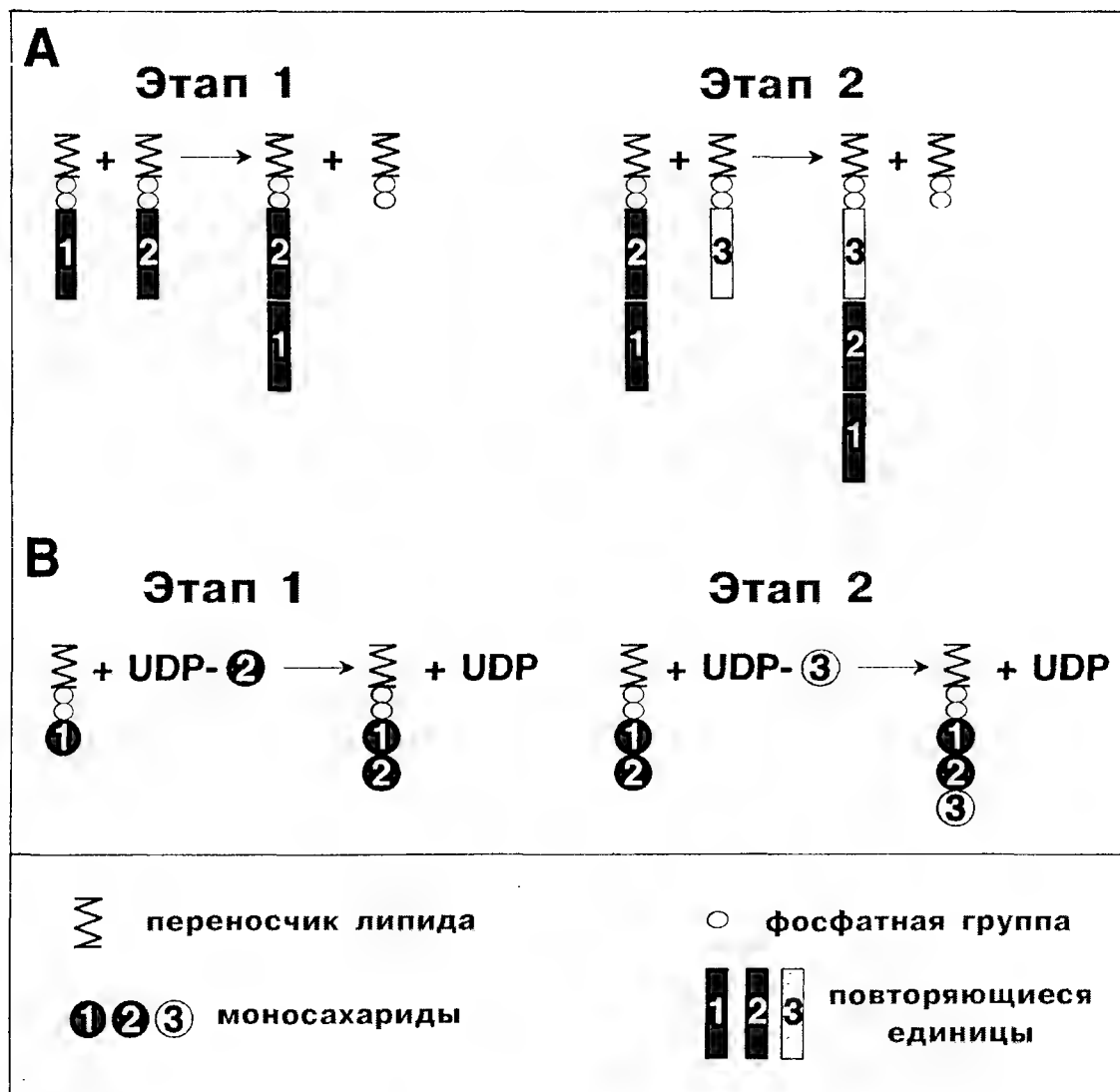


Рисунок 1. Механизмы полимеризации экзополисахаридов.

А – блочная полимеризация. На растущую молекулу полимера, связанную с липидом на нередуцирующем конце, переносятся связанные с липидом повторяющиеся субъединицы, которые присоединяются к редуцирующему концу.

В – последовательный перенос моносахаридов и присоединение к нередуцирующему концу растущей цепи (UDP = УДФ).

внутренней мембране. Белки, связанные с мембраной и участвующие в полимеризации или экспорте альгината, идентифицированы у *Pseudomonas aeruginosa* (May et al., 1991). Липид-связанные промежуточные продукты не обнаружены при биосинтезе альгината (Sutherland, 1982).

Участие липидных переносчиков и мембранных белков свидетельствует о том, что в биосинтез ЭПС происходит из цитоплазматических нуклеотид-дифосфатов во внутренней мембране. Полимеризация происходит во внутренней мембране или на наружной поверхности цитоплазматической мембраны. Примером такого рода является полимер маннозы штамма O9 *E. coli* (Kido et al., 1995). В то же время, синтез липид-связанных промежуточных продуктов в О-антигенах серогрупп

В и Е *Salmonella enterica* происходит с внутренней стороны, тогда как блочная полимеризация происходит с периплазматической стороны (McGrath, Osborn, 1991).

Модификации полисахаридов могут происходить на уровне липид-связанных предшественников до полимеризации (Carage et al., 1987; Vanderslice et al., 1989) или как замещения после полимеризации (May, Chakrabarty, 1994).

Экспорт полисахаридов на поверхность клеток изучен мало. АТФ-связывающие кассеты (АВС) транспортеров могут участвовать в транспорте гомополимеров, образующихся на внутренней мембране (Whitfield, Valvano, 1993; Whitfield, 1995). Хотя белки наружной мембраны участвуют в синтезе КПС группы II и альгината (May et al., 1991; Frosch et al., 1992), перенос полисахаридов через наружную мембрану охарактеризован слабо. Имеются данные об участии в этом процессе мембранных сайтов адгезии (связи Бауэра; Bauer, 1979, 1991; Kroncke et al., 1990a, 1990b), хотя данные по этому вопросу противоречивы (Whitfield, Valvano, 1993).

II.C. ПРИМЕРЫ

Одним из наиболее изученных ризобияльных ЭПС является сукциноглюкан, продуцируемый различными штаммами *Sinorhizobium meliloti*, *Agrobacterium* и *Alcaligenes* (Hisamatsu et al., 1980; Zevenhuizen, 1990). Структура сукциноглюкана, синтезируемого штаммом SU47 *S. meliloti* и его производным Rm1021 (Aman et al., 1981; Reinhold et al., 1994) и штаммом YE-2 *S. meliloti* (Matulova et al., 1994) изучен детально (рис. 2). Сукциноглюкан состоит из октасахаридных повторяющихся единиц, содержащих 1 галактозный и 7 глюкозных остатков, соединенных β -1 $\rightarrow$ 3, β -1 $\rightarrow$ 4 или β -1 $\rightarrow$ 6 гликозидными связями. Повторяющаяся единица может быть декорирована ацетильными, пирувильными или сукцинильными группами. Кроме сукциноглюкана, обычно обозначаемого ЭПС-1, штаммы *S. meliloti* могут продуцировать второй ЭПС, называемый галактоглюканом или ЭПС-2 (Her et al., 1990; Zevenhuizen, 1990) (рис. 2). ЭПС-2 содержит глюкозные и галактозные остатки в отношении 1:1, соединенные α -1 $\rightarrow$ 3 и β -1 $\rightarrow$ 3 гликозидными связями в его составе присутствуют ацетильные и пирувильные группы (Her et al., 1990). Галактоглюкан выделен также из культуральной жидкости *Agrobacterium radiobacter* (Zevenhuizen, 1989).

ЭПС, продуцируемый штаммом NGR234 *Rhizobium* sp., сходен с сукциноглюканом (Djordjevic et al., 1986; рис. 2): 5 сахаров на редуцирующем конце повторяющейся единицы этих ЭПС идентичны. В ЭПС штамма NGR234 обнаружены также ацетильные и пирувильные остатки. Многие штаммы различных биотипов *R. leguminosarum* имеют сходный базовый ЭПС (рис. 2), хотя состав замещающих групп может быть различным (McNeil et al., 1986; Hollingworth et al., 1988; Canter Cremers et al., 1990, 1991a, 1991b). Некоторые штаммы *R. elii* образуют ЭПС с иной базовой структурой (McNeil et al., 1986; Gil-Serrano et al., 1990).

Штаммы *Bradyrhizobium japonicum* образуют ЭПС, содержащий глюкозу, маннозу, галактозу, глюкуроновую кислоту и 4-О-метилглюкозу, тогда как *B. elkanii* (ранее тип II *B. japonicum*) продуцирует ЭПС, состоящий из рамнозы и 4-О-метилглюкуроновой кислоты (Dudman, 1978; Mort, Bauer, 1980, 1982; Puvanesarajah et al., 1987; Minimisawa, 1989) (рис. 2). Некоторые штаммы *B. japonicum* и *B. elkanii* образуют большие количества полисахаридов в клубеньках *Glycine max* (Newcomb, 1981; Streeter et al., 1992, 1994; An et al., 1995). Эти полисахариды накапливаются в симбиосоме и называются NPS (клубеньковые полисахариды). ЭПС и NPS *B. elkanii* имеют сходную структуру (An et al., 1995), тогда как NPS *B. japonicum* структурно отличается от ЭПС, образуемого в чистой культуре (Mort, Bauer, 1982; Streeter et al., 1992, 1994).

Некоторые штаммы ризобий образуют формы ЭПС, различающиеся по молекулярной массе. Две формы: высокомолекулярные полимеры и низкомолекулярные олигосахариды — выделены из культуральной жидкости *S. meliloti* (Amemura et al., 1983; Zevenhuizen, van Neerven, 1983; Leigh, Lee, 1988; Gonzalez et al., 1996), *Rhizobium* sp. NGR234, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Djordjevic et al., 1987), *Rhizobium* sp. GRH2 (Lopez-Lara et al., 1993), *B. japonicum* (Kosch et al., 1995).

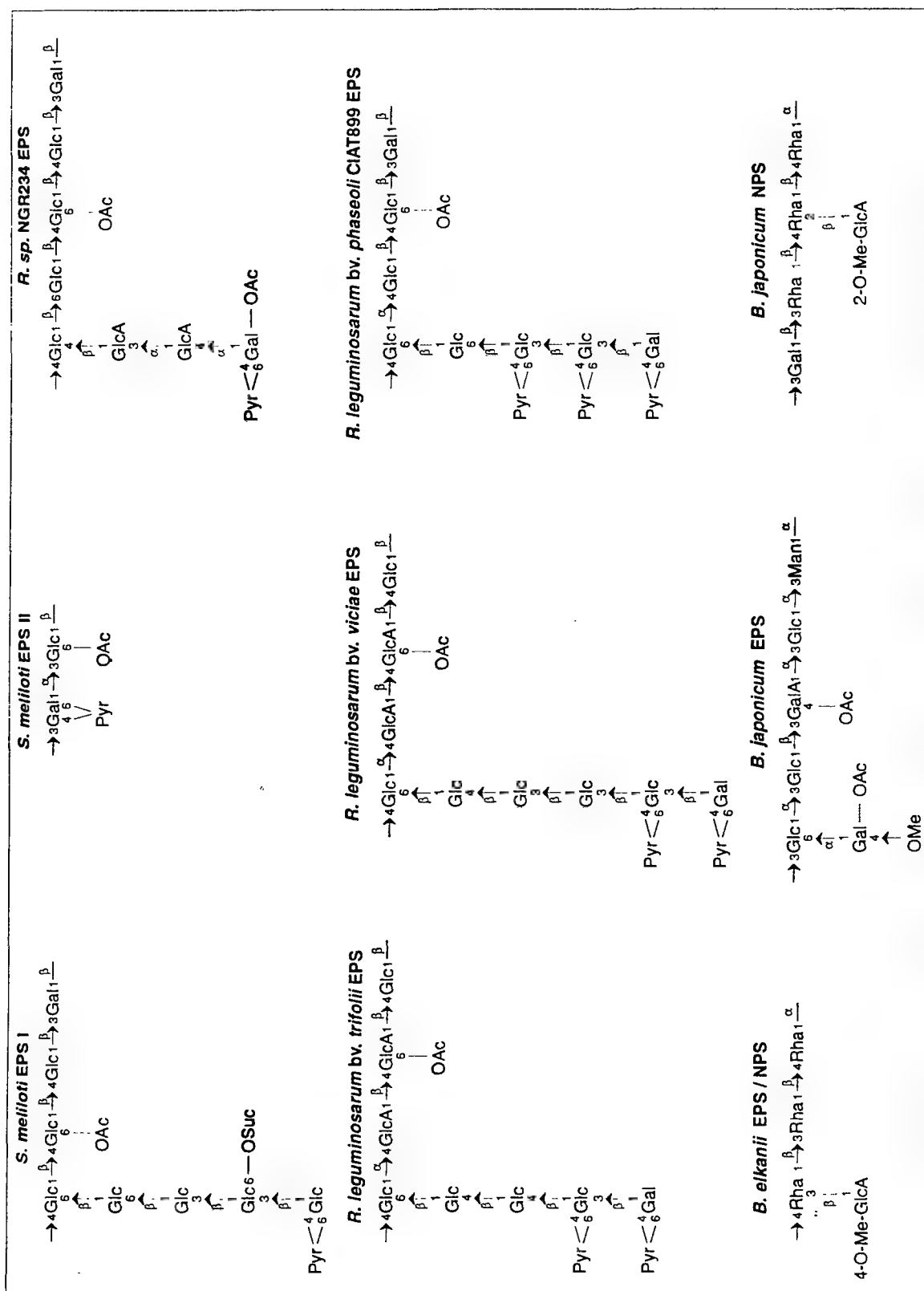


Рисунок 2. Структуры повторяющихся субъединиц в экзополисахаридах (EPS) ризобий. Ac — ацетат. Gal — галактоза, Glc — глюкоза, GalA — галактоновая кислота, GlcA — глюкуроновая кислота, Man — манноза, Me — метил, NPS — полисахарид, синтезируемый в клубеньках, Pyr — пирuvat, Rha — рамноза, Suc — сукцинат.

III. Генетика биосинтеза экзополисахаридов ризобий

Ранние работы по биосинтезу бактериальных ЭПС были связаны с их очисткой и структурным изучением. Использование генетических подходов расширило спектр этих работ, позволив провести анализ генов, участвующих в синтезе и регуляции образования ЭПС. Основой этой работы стало выделение транспозоновых мутантов, дефектных по синтезу ЭПС.

III.A. ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕННЫХ КЛАСТЕРОВ

Во многих случаях гены, контролирующие синтез ЭПС, образуют крупные кластеры, хотя описаны и случаи их дисперсного распределения по геному. Гены, участвующие в продукции ЭПС у ризобий, локализируются как в хромосоме, так и на крупных плазмидах. Выявленные кластеры содержат гены, контролирующие сборку повторяющихся единиц ЭПС, их модификацию, а также полимеризацию и экспорт. Иногда в этих кластерах расположены и гены, определяющие синтез дифосфат-нуклеотидов сахаров, являющихся предшественниками ЭПС. В том случае, когда эти гены участвуют также и в осуществлении функций “домашнего хозяйства”, в кластерах синтеза ЭПС имеются их дополнительные копии. Гены, участвующие в регуляции синтеза ЭПС, обычно не входят в состав данных кластеров.

Биосинтез ЭПС-I у *S. meliloti* является одним из наиболее изученных и используется в качестве модели для выяснения генетического контроля синтеза сложных гетерополисахаридов ризобий. Информация о генетике и биосинтезе ЭПС у других представителей *Rhizobiaceae* будет обсуждаться в сравнении с данными о синтезе ЭПС-I у *S. meliloti*.

III.A.1. Кластер *exo/exs* у штамма SU47 *S. meliloti*, контролирующий биосинтез ЭПС-I

Мутанты штамма SU47 *S. meliloti*, дефектные по синтезу ЭПС-I, обычно получают путем транспозонового мутагенеза (Finan et al., 1985; Leigh et al., 1985, 1987). Локусы, в которые встроился транспозон, картируют на хромосоме или на второй мегаплазмиде (Finan et al., 1986; Hynes et al., 1986; Long et al., 1988a, 1988b; Muller et al., 1988; Charles, Finan, 1990). Большой кластер генов (27 т.п.н.), участвующих в контроле синтеза ЭПС-I, расположен у штамма SU47 и его про-

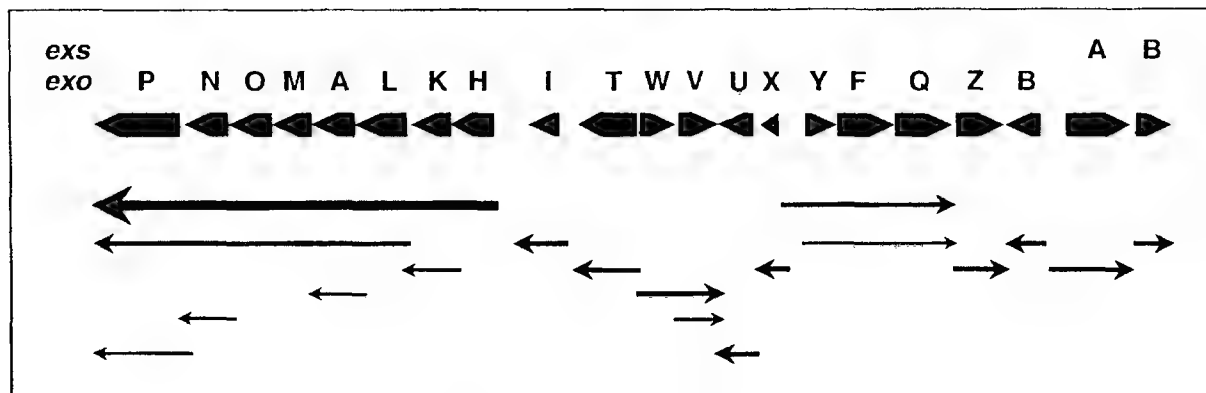


Рисунок 3. Генная и оперонная структура кластера *exo/exs* штамма SU47 *Sinorhizobium meliloti*. Размеры оперонов обозначены длиной стрелок, сила промоторов — толщиной стрелок.

изводных Rm1021 и Rm2011 на мегаплазмиде-2. Анализ нуклеотидных последовательностей позволил выявить 21 ген, обозначенный *exo* или *exs* (рис. 3) (Buendia et al., 1991; Reed et al., 1991a; Becker et al., 1993a, 1993b, 1993c, 1995b; Glucksmann et al., 1993a, 1993b; Muller et al., 1993). Ген *exsH* был локализован на расстоянии 7.4 т.п.н. от *exsB* (York, Walker, 1997). Кроме того, 5 локусов биосинтеза ЭПС-1 обнаружены на хромосоме. Они включают *exoR* (Doherty et al., 1988; Reed et al., 1991b), *exoS* (Doherty et al., 1988), *mucR* (Zhan et al., 1989; Keller et al., 1995), которые участвуют в регуляции, а также *exoC* (Finan et al., 1986) и *exoD* (Reed, Walker, 1991a, 1991b).

Гомологи продуктов *exo*- и *exs*-генов представляют собой белки с известными функциями. Их анализ показал, что данные гены участвуют в синтезе повторяющихся единиц, их замещении, полимеризации, экспорте и деградации ЭПС-1, а также в регуляции его биосинтеза (Buendia et al., 1991; Reed et al., 1991a; Becker et al., 1993a, 1993b, 1993c, 1995a, 1995b; Glucksmann et al., 1993a, 1993b; Muller et al., 1993; York, Walker, 1997) (табл. 1).

Кластер генов *exo/exs* состоит из нескольких оперонов (Buendia et al., 1991; Becker et al., 1993a, 1993b, 1993c, 1995b; Muller et al., 1993) (рис. 3). По меньшей мере 18 промоторов выявлено путем интеграционного плазмидного мутагенеза в штамме Rm2011 дикого типа или в мутантах, имеющих слияния *exo-lacZ* или *exs-lacZ*. Транскрипция, направляемая различными промоторами, приводит к образованию перекрывающихся РНК, что наиболее характерно для оперонов *exoHKLAMON*, *exoWV* и *exoYFQ*.

III.A.2. Кластер *exp*-генов штамма SU47 *S. meliloti*, контролирующий биосинтез ЭПС-2

Способность штамма SU47 *S. meliloti* продуцировать галактоглюкан (ЭПС-2) была впервые выявлена в результате получения мутаций в хромосомных генах *expR* (Glazebrook, Walker, 1989) или *mucR* (Zhan et al., 1989; Keller et al., 1995). Кластер *exp*-генов, направляющих синтез ЭПС-2, выявлен на мегаплазмиде-2 (Glazebrook, Walker, 1989). Он отделен от кластера *exo/exs* генов расстоянием около 200 т.п.н. (Charles, Finan, 1991). Анализ кластера *exp*-генов путем транспозонного мутагенеза показал, что он имеет размер около 23 т.п.н. и содержит по меньшей мере 6 групп комплементации (Glazebrook, Walker, 1989). Анализ нуклеотидной последовательности фрагмента 32 т.п.н., содержащего *exo*-кластер, позволил выявить 22 гена (Becker et al., 1997) (рис. 4). Анализ гомологии продуктов этих генов с известными белками показал, что *exp*-гены участвуют в синтезе дифосфо-сахаров, их полимеризации, регуляции данных генов и в экспорте ЭПС-2 из клетки (табл. 2).

III.A.3. Гомологи *exo*-генов штамма SU47 *S. meliloti*, присутствующие у других бактерий

У разных видов ризобий в синтезе ЭПС могут участвовать гены, гомологичные *exo*-генам штамма SU47 *S. meliloti*. У штамма NGR234 *Rhizobium* sp. на хромосоме выявлен *exo*-кластер (15 т.п.н.), состоящий из 4 групп комплементации и сходный с кластером генов штамма SU47 (Chen et al., 1988; Gray et al., 1990; Zhan et al., 1990). Дополнительная группа комплементации *exoG*, идентифицированная у штамма NGR234, не входит в основной *exo*-кластер (Chen et al., 1988). Гены из этого кластера могут комплементировать мутации штамма SU47 по генам *exoA*, *exoB*, *exoY*, *exoL*, *exoM*, *exoN*, *exoP* (Zhan et al., 1990). В то же время, комплементации мутаций по генам *exoC*, *exoD*, *exoK*, *exoH* выявлено не было. Поскольку у штамма SU47 гены *exoC* и *exoD* не входят в основной *exo*-кластер, можно предположить, что и у штамма NGR234 соответствующие гены также не сцеплены (Zhan et al., 1990). Продукт гена *exoH*, участвующий в сукцинировании ЭПС-1 (Leugh et al., 1987), по-видимому, является специфичным для штамма SU47, так как ЭПС штамма NGR234 не содержит сукцинильных групп (Djordjevic et al., 1986).

Гены, входящие в группу *exoB* штамма NGR234, не комплементируют *exo*-мутации *S. meliloti*, то есть данная группа комплементации может быть специфичной для NGR234. Опыты по гибридизации показали, что комплементационная группа *exoD* NGR234 соответствует генам *exoL*, *exoA* и *exoM* штамма SU47 (Zhan et al., 1990). Более того, комплементационные группы *exoY* и *exoC* NGR234

Таблица 1. Гены и генные продукты, вовлеченные в биосинтез ЭПС-1 у штамма SU47 *S. meliloti*

Белок	Локализация белка ^a	Функция белка, установленная экспериментально или по гомологии	Локализация гена ^b	Ссылки
ExoC	CY	Фосфоглюкомутаза	CHR	Uttaro et al., 1990
ExoB	CY	УДФ-глюкозо-4-эпимераза	MP2	Buendia et al., 1991
ExoN	CY	УДФ-глюкозо-фосфорилаза	MP2	Becker et al., 1993b; Glucksmann et al., 1993b
ExoY	CMa	Галактозил-трансфераза	MP2	Muller et al., 1993; Reuber, Walker, 1993a
ExoA	CMa	Гликозил-трансфераза	MP2	Becker et al., 1993b; Glucksmann et al., 1993a; Reuber, Walker, 1993a
ExoL	CY	Гликозил-трансфераза	MP2	Becker et al., 1993b; Glucksmann et al., 1993a; Reuber, Walker, 1993a
ExoM	CY	Гликозил-трансфераза	MP2	Becker et al., 1993b; Glucksmann et al., 1993a; Reuber, Walker, 1993a
ExoO	CY	Гликозил-трансфераза	MP2	Becker et al., 1993b; Glucksmann et al., 1993a; Reuber, Walker, 1993a
ExoU	CMa	Гликозил-трансфераза	MP2	Becker et al., 1993c; Glucksmann et al., 1993a; Reuber, Walker, 1993a
ExoW	CY	Гликозил-трансфераза	MP2	Becker et al., 1993c; Glucksmann et al., 1993a; Reuber, Walker, 1993a
ExoZ	CMi	Ацетил-трансфераза	MP2	Buendia et al., 1991; Reuber, Walker, 1993b
ExoH	CMi	Сукцинил-трансфераза	MP2	Leigh et al., 1987; Becker et al., 1993a
ExoV	CY	Пирувил-трансфераза	MP2	Becker et al., 1993c; Glucksmann et al., 1993b; Reuber, Walker, 1993a
ExoF	PP	Перенос галактозы	MP2	Muller et al., 1993; Reuber, Walker, 1993a
ExoQ	CMi	Экспорт и полимеризация	MP2	Muller et al., 1993; Reuber, Walker, 1993a
ExoT	CMi	Экспорт и полимеризация	MP2	Becker et al., 1993c; Glucksmann et al., 1993b; Reuber, Walker, 1993a
ExoP	CMi	Экспорт и полимеризация	MP2	Becker et al., 1993c, 1995a; Glucksmann et al., 1993b; Reuber, Walker, 1993a
ExsA	CMi	Экспорт	MP2	Becker et al., 1995b
ExoK	PP или EC	Эндо-β-1,3-1,4-глюканаза	MP2	Becker et al., 1993a
ExsH	EC	Эндоглюканаза	MP2	York, Walker, 1997
ExoX	CMa	Негативный регулятор	MP2	Zhan, Leigh, 1990; Reed et al., 1991a; Muller et al., 1993
ExoI	PP или EC	Неизвестна	MP2	Becker et al., 1993c
ExsB	CY	Негативный регулятор	MP2	Becker et al., 1995b
ExoR	CY	Негативный регулятор	CHR	Doherty et al., 1988; Reed et al., 1991b; Ozga et al., 1994
ExoS	CMa	Негативный регулятор	CHR	Doherty et al., 1988; Ozga et al., 1994; Ostas et al., 1995
MucR	CY	Позитивный регулятор	CHR	Zhan et al., 1989; Keller et al., 1995
ExoD	CY	Неизвестна	CHR	Reed, Walker, 1991a, 1991b

^aСубклеточная локализация белков предсказана на основании данных о гидрофобности аминокислотной последовательности или результатов изучения ген-слияний: CY — цитоплазма, CM — шитоплазматическая мембрана (i — интегральный мембранный белок, a — белок, прикрепленный к мембране), PP — периплазматический, EC — внеклеточный.

^bCHR — хромосома, MP2 — метаблазмида-2.

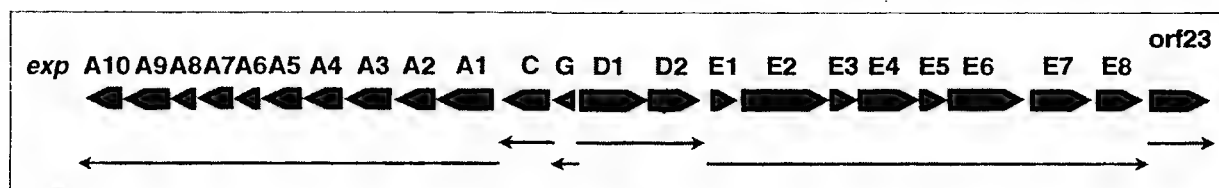


Рисунок 4. Генная и оперонная структура кластера *exp* штамма SU47 *Sinorhizobium meliloti*. Размеры оперонов обозначены длиной стрелок.

соответствуют группам *exoY* и *exoB* SU47. Секвенирование ДНК района *exoX-exoY* показало его идентичность у обоих штаммов (Gray et al., 1990), что соответствует данным о близости структур кислых ЭПС этих бактерий (Aman et al., 1981; Djordjevic et al., 1986; Reinhold et al., 1994). Интересно, что ген, сходный с *exoX*, выявлен также на симбиотической плазмиде pNGR234a *Rhizobium* sp. (Freiberg et al., 1997).

Гены, гомологичные *exoY* штамма SU47, идентифицированы у *R. leguminosarum*, биотипов *viciae* и *phaseoli* (Borthakur et al., 1986, 1988; Latchford et al., 1991; Ivashina et al., 1994). Ген *psiA*, кодирующий белок, сходный с *ExoX* SU47, обнаружен у *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Borthakur et al., 1985, 1988; Latchford et al., 1991; Mimmack et al., 1994a, 1994b). У *R. leguminosarum* bv. *viciae* выявлен фрагмент хромосомы размером 5.5 т.п.н., участвующий в контроле биосинтеза ЭПС и содержащий гены *pssC*, *pssD*, *pssE*, *pssF*, *pssG*, *pssH*, но не сцепленный с генами *pssA* и *psiA* (Ivashina et al., 1995, 1996). Предполагаемые продукты генов *pssC*, *pssD*, *pssE*, *pssF* сходны с белками *ExoM*, *ExoO*, *ExoW* штамма SU47. По-видимому, эти генные продукты функционируют как глицерол-трансферазы, формирующие бета-гликозидные связи. Продукт гена *pssH* проявил сходство с глицерол-трансферазами *Streptomyces* C5 и *Erwinia herbicola* (Ivashina et al., 1996).

Кроме того, у *R. leguminosarum* bv. *trifolii* выявлены 4 гена (*pssA*, *pssC*, *pssD*, *pssE*), также вовлеченные в синтез ЭПС (van Workum et al., 1997). Продукт гена *pssA* идентичен белку Pss4 *R. leguminosarum* bv. *viciae* и гомологичен белку *ExoY* *S. meliloti*. Гены *pssD* и *pssE* образуют оперон, тесно сцепленный с *pssC*. Эти 3 гена, которые не являются тесно сцепленными с *pssA*, кодируют белки, сходные с различными гликозил-трансферазами (van Workum et al., 1997).

Генетический локус, функционально гомологичный *exoB* *S. meliloti*, также выявлен у *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Canter Cremers et al., 1990) и *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Sanches-Andujar et al., 1997). В дополнение к этому, у *R. leguminosarum* bv. *viciae* идентифицирован локус, предположительно кодирующий галактозил-трансферазу (Breedveld et al., 1993).

На "несимбиотической" плазмиде *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (300 т.п.н.) с использованием Tn5-мутантов был выявлен кластер *exo*-генов. Два гена кодируют белки, гомологичные компонентам АВС-транспортной системы, вовлеченной в секрецию белков, независимую от сигнальных пептидов (Krol et al., 1994, 1996). Интересно, что сходные белки, вовлеченные в биосинтез ЭПС-2 у штамма SU47 *S. meliloti*, кодируются генами *expD1* и *expD2* (Becker et al., 1997). У *B. japonicum* идентифицированы гены, кодирующие белки гомологичные *exoB* и *exoP* штамма SU47 (Parniske et al., 1993; Kosch et al., 1995).

III.B. РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ

Адаптация синтеза ЭПС к внешним условиям требует наличия сложных регуляторных систем, в которых обеспечивается взаимодействием различных компонентов. Регуляция синтеза ЭПС происходит на разных уровнях генной экспрессии. Механизмы, определяющие транскрипцию и трансляцию генов синтеза ЭПС, а также активность участвующих в нем белков, представляет большой интерес.

Таблица 2. Предполагаемые функции продуктов *exp*-генов штамма SU47 *S. meliloti* (Becker et al., 1997)

Белок	Локализация ¹	Функции, предсказанные на основе гомологии
ExpG	CY	Транскрипционный регулятор
ExpA7	CY	Глюкозо-1-фосфат-тимидилил-трансфераза
ExpA8	CY	dTDP-4-дегидрорамнозо-3,5-эпимераза
ExpA9	CY	dTDP-глюкозо-4,6-дегидратаза
ExpA10	CY	dTDP-4-дегидрорамнозо-редуктаза
ExpA2	CY	Гликозил-трансфераза
ExpE2	CY	Гликозил-трансфераза
ExpA3	CY	Гликозил-трансфераза
ExpC	CMa	Гликозил-трансфераза
ExpE4	CY	Гликозил-трансфераза
ExpE7	CY	Гликозил-трансфераза
ExpD1	CMi	ABC-транспортный белок экспортного комплекса протеиназ
ExpD2	CM или OM	Белок MFP экспортного комплекса протеиназ
ExpE1	OM или EC	Секретируемый Ca ²⁺ связывающий белок
ExpE3	CY	Метилтрансфераза
ORF23	PP	Периплазматический связывающий белок
ExpA1	CY	Неизвестна
ExpA4	CY	Неизвестна
ExpA5	CY	Неизвестна
ExpA6	PP	Неизвестна
ExpE5	CMa	Неизвестна
ExpE6	CMi	Неизвестна
ExpE8	CY	Неизвестна

¹Субклеточная локализация белков предсказана на основании гидрофобности аминокислотных последовательностей: CY — цитоплазма, CM — цитоплазматическая мембрана (i — интегральный мембранный белок, a — белок, прикрепленный к мембране), PP — периплазма, OM — наружная мембрана, EC — внеклеточный.

III.B.1. *S. meliloti*

У штамма SU47 *S. meliloti* синтез ЭПС-1 активируется при голодании по различным неуглеводным компонентам, таким как азот, фосфор, сера (Leigh et al., 1985; Doherty et al., 1988), а фосфатное голодание стимулирует синтез ЭПС-2 (Zhan et al., 1991). Изучение штамма SU47 показало, что синтез ЭПС может модифицироваться при изменении осмотического давления (Breedveld et al., 1990b). Низкое давление приводит к преимущественному образованию низкомолекулярных компонентов ЭПС-1, а продукция высокомолекулярных компонентов возрастает при высоком давлении. Штамм YE *S. meliloti* продуцирует высокомолекулярный ЭПС-2 и низкомолекулярный ЭПС-1 при высоких концентрациях NaCl (Zevenhuizen, Faleschini, 1991). Повышение концентрации NaCl усиливает продукцию высокомолекулярного ЭПС-1 за счет ЭПС-2 и низкомолекулярных компонентов ЭПС-1.

У штамма SU47 получены две мутации по хромосомным генам *exoR* и *exoS*, повышающие уровень синтеза ЭПС-1 (Doherty et al., 1988) и влияющие на экспрессию *exo*-генов (Reed et al., 1991b; Leigh et al., 1993; Ozga et al., 1994). Лимитация клеток по аммонии обычно усиливает синтез ЭПС-1. Мутант по гену *exoR* имел повышенную активность синтеза ЭПС-1 вне зависимости от присутствия аммония, тогда как его отсутствие активировало синтез ЭПС-1 у мутанта по гену *exoS* (Doherty et al., 1988). По другим данным (Ozga et al., 1994), ген *exoR* не является необходимым для регуляции синтеза ЭПС-1 аммонием. Анализ синтеза мРНК *exo*-генов показал, что белок ExoR влияет на транскрипцию некоторых из них (Reed et al., 1991b). Усиленная экспрессия трансляционных слияний генов *exoA*, *exoF*, *exoQ* с *phoA* на фоне мутаций по *exoR* и *exoS* соответствует этому наблюдению (Reuber et al., 1991). Эти мутации не действовали на экспрессию трансляцион-

ных слияний генов *exoT* и *exoB* (Reuber et al., 1991). Кроме того, экспрессия транскрипционного слияния *exoY-lacZ* усиливалась на фоне мутации в *exoR* (Ozga et al., 1994). Сверхпродукция ЭПС-1 у мутанта по гену *exoR* супрессировалась мутациями в локусе *exoS* (Leigh et al., 1993; Ozga et al., 1994). Эти супрессорные мутации снижали экспрессию *exoY-lacZ* на фоне мутации *exoR* (Ozga et al., 1994).

Хотя *ExoR* не имеет гомологов среди известных регуляторов (Reed et al., 1991b), *ExoS* оказался гомологичным белку *ChvG* (Osteras et al., 1995) и сходен с сенсорными белками двухкомпонентных регуляторных систем. Значит, *ExoS* может быть вовлечен в восприятие средовых воздействий, которые влияют на синтез ЭПС-1. Второй, ДНК-связывающий компонент этой регуляторной системы, *ChvI*, также может участвовать в регуляции синтеза ЭПС-1.

Соотношение *exoX* и *exoT* влияет на уровень продукции ЭПС-1 у штамма SU47 (Zhan, Leigh, 1990; Reed et al., 1991a; Muller et al., 1993). Оба гена локализованы в *exo/exs* кластере на мегаплазмиде-2. У мутантов по *exoX* наблюдается сверхпродукция ЭПС-1, тогда как многокопийность этого гена подавляет синтез ЭПС-1. Одновременное присутствие *exoX* и *exoY* на многокопийной плазмиде позволяет преодолеть действие многокопийности по *exoX*. Хотя экспрессия *exo*-генов не зависит от дозы *exoX* и *exoY*, предполагается, что *ExoX* функционирует как посттранскрипционный ингибитор *ExoY*, который кодирует галактозил-трансферазу, катализирующую начальную стадию синтеза ЭПС-1 (Reed et al., 1991a; Muller et al., 1993; Reuber, Walker, 1993). Оба белка, по-видимому, связаны с внутренней мембраной (Muller et al., 1993), что говорит о возможности белок-белковых взаимодействий. Более того, *exsB* также локализован в генном кластере *exo/exs* и может кодировать негативный регулятор, влияющий на посттранскрипционный уровень экспрессии *exo*-генов (Becker et al., 1995b). Сверхэкспрессия гена *sydM*, вовлеченного в регуляцию *nod*-генов, усиливает синтез ЭПС у штамма SU47, однако регуляторные механизмы этого неясны (Mulligan, Long, 1989). Поскольку гены *exoA* и *exoB* необходимы для усиления синтеза ЭПС, а *exoA* специфически участвует в продукции ЭПС-1, вероятно, что происходит стимуляция синтеза ЭПС-1 (Mulligan, Long, 1989). Ген *sydA*, который находится вблизи *sydM*, также необходим для усиления продукции ЭПС (глава 19).

Показано, что трансляционные слияния генов *exoA*, *exoP*, *exoF* с *phoA* экспрессируются главным образом в инфекционной зоне клубеньков люцерны, что может быть связано с подавлением экспрессии *exo*-генов при симбиозе (Reuber et al., 1991).

Обычно штамм SU47 продуцирует только ЭПС-1, а синтез ЭПС-2 активируется при голодании по фосфату (Zhan et al., 1991). Оно стимулирует бета-галактозидазную активность транскрипционных слияний *exp-lacZ* и нарушает транскрипцию по меньшей мере одного из *exp*-генов (Zhan et al., 1991). Получены два мутанта SU47, которые конститутивно синтезируют ЭПС-2. Одна из мутаций затрагивает хромосомный ген *mucR* и приводит к конститутивному синтезу ЭПС-2, а также к отсутствию ЭПС-1 (Zhan et al., 1989; Keller et al., 1995; Bertram-Drogatz et al., 1997b). В супернатанте мутанта по *mucR* были выявлены только низкомолекулярные компоненты ЭПС-1 (Keller et al., 1995; Bertram-Drogatz et al., 1997b). Белок *MucR* (Keller et al., 1995) гомологичен белку *Ros Agrobacterium*, который репрессирует опероны *virC* и *virD*, а также активирует продукцию ЭПС (Cooley et al., 1991; d'Souza-Ault et al., 1993; Brightwell et al., 1995). Более того, гены *mucR* и *ros* негативно авторегулируются (Cooley et al., 1991; Keller et al., 1995). Потенциальный мотив "цинковых пальцев" (типа C_2H_2) выявлен в аминокислотных последовательностях соответствующих белков. Показано, что белок *Ros* может специфически связываться с промоторами района *virC/virD* агробактерий (d'Souza-Ault et al., 1993). Гены *ros*, *virC* и *virD* имеют в промоторах инвертированный повтор, названный *ros-box*, который, возможно, специфически связывается с белком *Ros*.

Экспрессия транскрипционных слияний *exp-lacZ*, локализованных в 5 различных группах комплементации *exp*-генов, была индуцирована на фоне мутации в гене *mucR* (Keller et al., 1995; Becker et al., 1997). Эта мутация не нарушает транскрипцию большинства слияний *exo-lacZ* (Keller et al., 1995). Только для генов *exoY*, *exoF* и *exoK* наблюдали небольшое ослабление транскрипции на фоне мутации по *mucR* (Leigh et al., 1993; Keller et al., 1995). При этом экспрессия транскрипционных слияний генов *exoH* и *exoX* усиливалась (Bertram-Drogatz et al., 1997b). Позитивная регу-

ляция транскрипции, зависящая от промотора, расположенного вверх от гена *exoY*, влияет на экспрессию оперона *exoYFQ*. Поскольку соотношение *exoX* и *exoY* действует на синтез ЭПС-1, а *exoY* участвует в ранних стадиях этого процесса, активация транскрипции *exoY* геном *mucR* может быть одной из причин регуляции биосинтеза ЭПС-1.

Показано, что белок MucR может специфически связываться с промоторами *mucR*, *exoY*, *exoH*, а инвертированные повторы, гомологичные *ros-box* и регулируемые белком Ros *Agrobacterium*, найдены в промоторах генов *mucR* и *exoY* *S. meliloti* (Bertram-Drogatz et al., 1997a, 1997b). Значит, MucR способен к негативной авторегуляции синтеза, а также к активации *exoY* и слабой экспрессии транскрипции *exoH*. Интересно, что у *S. meliloti* идентифицирован белок ORF2, который на 50% гомологичен MucR (Barnett, Long, 1997), но его функции неясны.

В дополнение к мутантам *mucR*, у штамма SU47 выявлен мутант по гену *expR*, обладающий повышенной экспрессией ЭПС-2 благодаря индукции *exp*-генов (Glazebrook, Walker, 1989). Спонтанные мутации, отвечающие за фенотип мутанта *expR*, картированы на хромосоме. В отличие от мутантов *mucR*, образующих только высокомолекулярный ЭПС-2, мутант по *expR* продуцировал как высоко-, так и низкомолекулярные фракции (Gonzalez et al., 1996).

И наконец, регулятор транскрипции генов синтеза ЭПС может кодироваться геном *expG* локализованным в *exp*-кластере мегаплазмиды-2 (Becker et al., 1997). Продукт этого гена проявляет слабую гомологию с белками семейства MarR транскрипционных регуляторов, которые связываются с мотивами “спираль-поворот-спираль”. Кроме того, у штамма SU47 выявлен ген *mucS*, идентичный *expG* (Astele, Leigh, 1996) и необходимый для индукции синтеза ЭПС-2 низкими концентрациями фосфата и дополнительными копиями *exp*-генов. Показано, что *mucS* (*expG*) необходим для активации по крайней мере одной группы комплементации (*expE*) при фосфатном голодании. Соответствующие белки могут функционировать как активаторы *exp*-генов. Данные о регуляции синтеза ЭПС у штамма SU47 *S. meliloti* суммированы на рисунке 5.

III.B.2. *Rhizobium* sp. (штамм NGR234) и *R. leguminosarum*

Гомологи генов штамма SU47 *S. meliloti*, участвующих в синтезе ЭПС, выявлены у штамма NGR234 *Rhizobium* sp., а также у *R. leguminosarum* bv. *viciae* и *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Гены *exoX* и *exoY* у штаммов SU47 и NGR234 весьма сходны (Gray et al., 1990). Как и у SU47, у штамма NGR234 соотношение числа копий *exoX* и *exoY* определяет уровень продукции ЭПС. Большое число копий *exoX* у NGR234 нарушает продукцию ЭПС как в гомологичном штамме, так и в гетерологичных штаммах SU47 и *R. fredii*. Поскольку взаимное влияние этих генов на транскрипционную регуляцию показать не удалось, было высказано предположение о наличии посттранскрипционного механизма (Gray, Rolfe, 1990, 1992).

Ген *pss4* (*pss2*, *pssA*) *R. leguminosarum* bv. *viciae* и ген *pssA* *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* кодируют белки, гомологичные ExoY штамма SU47 (Borthakur et al., 1986, 1988; Latchford et al., 1991; Ivashina et al., 1994). Как и ExoY, белок PssA находится во внутренней мембране (Latchford et al., 1991). Кроме того, ген *psiA*, кодирующий белок, сходный с ExoX штамма SU47 *S. meliloti* и NGR234 *Rhizobium* sp., выявлен на симбиотической плазмиде pRP2J1 *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Borthakur et al., 1985, 1988; Latchford et al., 1991; Mimmack et al., 1994a, 1994b). Гидрофатические профили белков ExoX и PsiA сходны: оба содержат гидрофобный N-терминальный и гидрофильный C-терминальный конец (Gray et al., 1990). Кроме того, показана ассоциация белка PsiA с мембраной (Latchford et al., 1991; Mimmack et al., 1994b). Множественные копии гена *psiA* нарушают продукцию ЭПС у *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Borthakur et al., 1985; Latchford et al., 1991). Ген *psrA*, который также локализован на симбиотической плазмиде pRP2J1, при амплификации восстанавливают потерю синтеза ЭПС, вызванную многокопийностью по *psiA* (Borthakur, Johnston, 1987; Mimmack et al., 1994a). Показано, что белок PsrA репрессирует транскрипцию *psiA* и сходен с транскрипционными регуляторами, содержащими домен для связывания с мотивом “спираль-поворот-спираль” (Borthakur, Johnston, 1987; Mimmack et al., 1994a). При анализе слияний с *gusA* выяснилось, что ген *psiA*, в отличие от *pssA* экспрессируется в симбиотической зоне клубеньков *Phaseolus*. Это показывает, что *psiA* может участвовать в негативной регуляции гена *pss* в клубеньках.

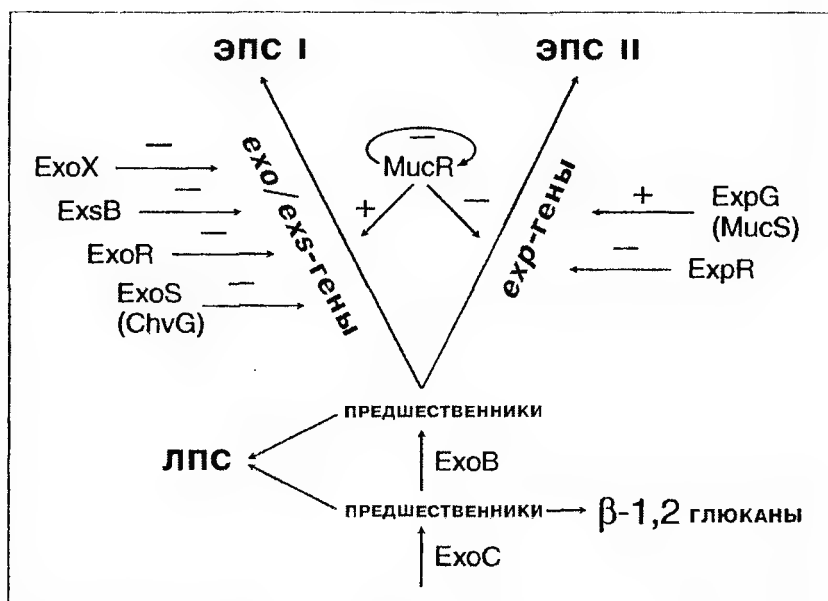


Рисунок 5. Общая схема регуляции биосинтеза экзополисахаридов (ЭПС), липополисахаридов (ЛПС) и глюканов у штамма SU47 *Sinorhizobium meliloti* (по данным работ: Glazebrook, Walker, 1989; Leigh et al., 1993; Becker et al., 1995a, 1997; Astete, Leigh, 1996).

Ген *mucR* штамма SU47 *S. meliloti*, участвующий в регуляции синтеза ЭПС, обнаружен путем блот-гибридизации у *Rhizobium* sp. NGR234, *R. fredii*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* и *A. tumefaciens* (Keller et al., 1995). Гены *ros*, гомологичные *mucR*, секвенированы у *A. tumefaciens* и *A. radiobacter* (Cooley et al., 1991; d'Souza-Ault et al., 1993; Brightwell et al., 1995) и у *Rhizobium etli* (Bittinger et al., 1997). Этот ген гомологичен *mucR* и влияет на нодуляционную конкурентоспособность и гидрофобность клеточной поверхности *R. etli*. Более того, два гена, сходные с *mucR*, выявлены на симбиотической плазмиде pNGR234a (Freiberg et al., 1997). У *A. radiobacter* активность транскрипционных слияний *exoY-phoA* снижена на фоне *ros*-мутаций, то есть экспрессия *exoY* важна на ранних стадиях биосинтеза ЭПС и активируется геном *ros* (Tiburtius et al., 1996). При этом выяснилось, что несовершенный инвертированный повтор перед геном *exoY*, сходен с последовательностями *ros-box*, находящимися перед геном *ros*, а также перед генами *virC* и *virD* *A. tumefaciens* (d'Souza-Ault et al., 1993). Сходные последовательности выявлены перед генами *exoY* и *mucR* *S. meliloti* (Bertram-Drogatz et al., 1997). Специфическая связывающая активность белка Ros на промоторе региона *virC/virD* *A. tumefaciens* и белка MucR на промоторах генов *mucR*, *exoY*, *exoH* *S. meliloti*, зависит от последовательностей, сходных с *ros-box* (d'Souza-Ault et al., 1993; Bertram-Drogatz et al., 1997a, 1997b). Это показывает, что белки Ros и MucR взаимодействуют со связывающими сайтами перед генами-мишенями. Кроме того, гомолог гена *exoR* *S. meliloti* идентифицирован у *R. leguminosarum* bv. *viceae* (Reeve et al., 1997).

III.C. БИОСИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ У ШТАММА SU47 *S. MELILOTI*

Лишь некоторые пути биосинтеза ЭПС у ризобий изучены в деталях. Сочетание генетических и биохимических подходов привело к созданию подробной модели синтеза ЭПС-I у штамма SU47 *S. meliloti*. Она будет рассмотрена как пример продукции гетерополисахаридов.

III.C.1. ЭПС-1

Путь биосинтеза ЭПС-1 напоминает пути синтеза других гетерополисахаридов, состоящих из повторяющихся единиц (рис. 6). Показано, что повторяющиеся единицы собираются на липидном носителе, что приводит к образованию полипренил-дифосфатных октамерных продуктов (Tolmasky et al., 1980, 1982). УДФ-галактоза и УДФ-глюкоза были выявлены как цитоплазматические предшественники образования связанной с липидами повторяющейся единицы (Buendia et al., 1991; Becker et al., 1993b; Glucksmann et al., 1993b; Reuber, Walker, 1993a). Белки EhoC, EhoB, EhoN участвуют в биосинтезе этих предшественников. Фосфоглюкомутаза, кодируемая геном *ehoC*, превращает глюкозо-6-фосфат в глюкозо-1-фосфат (Uttaro et al., 1990). Эта энзиматическая активность важна для биосинтеза ЭПС-1, ЭПС-2, липополисахаридов (ЛПС) и β -(1-2)-глюканов (Zhan et al., 1989; Uttaro et al., 1990). Белок EhoB проявляет УДФ-глюкозо-4-эпимеразную активность (Buendia et al., 1991). Превращение УДФ-глюкозы в УДФ-галактозу, кодируемое этим белком, важно для образования ЭПС и ЛПС. В отличие от *galE*-мутантов *E. coli* (Fukasawa, Nikaido, 1961), мутанты по *ehoB* штамма SU47 *S. meliloti* могут использовать галактозу как единственный источник углерода, так как эти бактерии используют путь Делея-Дудорова для превращения галактозы (Arias et al., 1986). УДФ-галактоза может возникать только путем эпимеризации УДФ-глюкозы, так как галактокиназная активность у *S. meliloti* отсутствует. Поэтому *ehoB*-мутанты не способны продуцировать ЭПС-1, ЭПС-2 и ЛПС, тогда как синтез β -(1-2)-глюканов не изменен (Zhan et al., 1989; Canter Cremers et al., 1990; Buendia et al., 1991). Белок EhoN проявляет активность пирофосфорилазы (данные авторов), катализирующей синтез УДФ-глюкозы из глюкозо-1-фосфата и УТФ. Мутации в гене *ehoN* снижают продукцию ЭПС-1. Это снижение может быть связано по крайней мере с одним из дополнительных генов, кодирующих этот фермент, хотя гомологи *ehoN* не были выявлены путем гибридизации по Саузерну (Glucksmann et al., 1993b). Пирофосфорилаза dTDP-глюкозы может замещать EhoN, так как этот фермент также проявляет УДФ-глюкозо-пирофосфорилазную активность (Mello, Glase, 1965).

Функции большинства *eho*-генов изучены путем анализа липид-связанных промежуточных продуктов, которые накапливаются у *eho*-мутантов (Reuber, Walker, 1993a). Последовательная активность 8 гликозил-трансфераз и 3 ферментов, осуществляющих замещения, приводит к формированию липид-связанной октасахаридной повторяющейся единицы. Белки EhoY и EhoF участвуют в первоначальном переносе галактозилного остатка на липидный носитель. Белки EhoA, EhoL, EhoM, EhoO, EhoU, EhoW обеспечивают присоединение последующих остатков сахаров. Гликозил-трансфераза, ответственная за присоединение терминального сахара к повторяющейся единице, пока не идентифицирована. Анализ ЭПС-1, продуцируемого мутантами по генам *ehoH* и *ehoZ*, показал, что продукт первого гена участвует в сукцинировании (Leigh et al., 1987), а продукт второго — в ацетилировании (Reuber, Walker, 1993b). Мутант по гену *ehoM* блокирован на стадии присоединения 4-го сахарного остатка и накапливает неацетилированный и ацетилированный липид-связанные трисахариды (Reuber, Walker, 1993a). Мутанты по генам *ehoP*, *ehoQ*, *ehoT*, вовлеченным в полимеризацию и экспорт ЭПС-1, накапливают липид-связанные октасахаридные субъединицы, которые в различной степени ацетилированы, сукцинированы и пирувиллированы. Это показывает, что присоединение дополнительных остатков может происходить до полимеризации. Неацетилированный и несукцинированный ЭПС-1 может быть полимеризован и экспортирован. Поскольку у мутантов по гену *ehoV*, не способных к пирувиллированию, секреция полимерного ЭПС-1 не происходит, процесс пирувиллирования, по-видимому, необходим для полимеризации и экспорта (Becker et al., 1993c; Glucksmann et al., 1993b; Reuber, Walker, 1993a).

Показано, что белок EhoQ вовлечен в биосинтез высокомолекулярного ЭПС-1, тогда как EhoT участвует в синтезе тримеров и тетрамеров октасахарида (Gonzalez et al., 1996b). Поскольку в супернатанте культуры *ehoP*-мутантов выявляли только мономеры октасахарида, очевидно, что этот ген участвует в образовании как высокомолекулярных, так и низкомолекулярных продуктов полимеризации ЭПС-1. Мембранная топология белка EhoP была изучена с помощью трансляционных слияний гена *ehoP* с репортерами *lacZ* и *phoA*. Оказалось, что EhoP состоит из N-терминального домена, локализованного в основном в периплазме, и цитоплазматического C-терминального домена (Becker et al., 1995a). N-терминальный домен EhoP напоминает белок CLD,

участвующий в определении длины О-антигенной цепи некоторых энтеробактерий. Короткий консенсусный мотив, общий для белков ExoP и CLD, был найден в N-терминальном домене первого из них (Becker et al., 1995a; Stingle et al., 1996), однако функциональная важность этого мотива пока неясна. С-терминальный домен белка ExoP проявляет гомологию с АТФ-азами и содержит предполагаемый нуклеотид-связывающий сайт. Этот домен не выявлен в CLD-белках, однако найден в гомологичных белках, участвующих в полимеризации и экспорте ЭПС, например, в белке EpsB *Pseudomonas solanacearum* (Huang, Shell, 1995), в белке Wzs *Escherichia coli* K12 (Stevenson et al., 1996) и AmsA *Erwinia amylovora* (Bugert, Geidel, 1995). N- и С-терминальные домены белков, гомологичных ExoP штамма SU47 *S. meliloti*, могут кодироваться одним геном или двумя смежными генами в случае белков CpsC и CpsD *Streptococcus thermophilus* Sfi6 (Stingle et al., 1996). Мутанты штамма SU47, несущие делетированные гены *exoP**, кодирующие лишь N-терминальный домен белкового продукта, имеют сниженный уровень синтеза ЭПС-1 (Becker et al., 1995a). Это снижение может быть супрессировано мутацией по негативному регулятору *exoR*. Соотношение высоко- и низкомолекулярных компонентов ЭПС-1 значительно снижено у мутантов *exoP**, тогда как в двойном мутанте *exoP*/exoR* выявлен лишь низкомолекулярный ЭПС-1 (Becker et al., 1995a). Сходный фенотип характерен для мутантов *B. japonicum* с нарушенным С-терминальным доменом ExoP (Kosch et al., 1995). Можно предположить, что ExoP определяет соотношение высоко- и низкомолекулярных компонентов ЭПС.

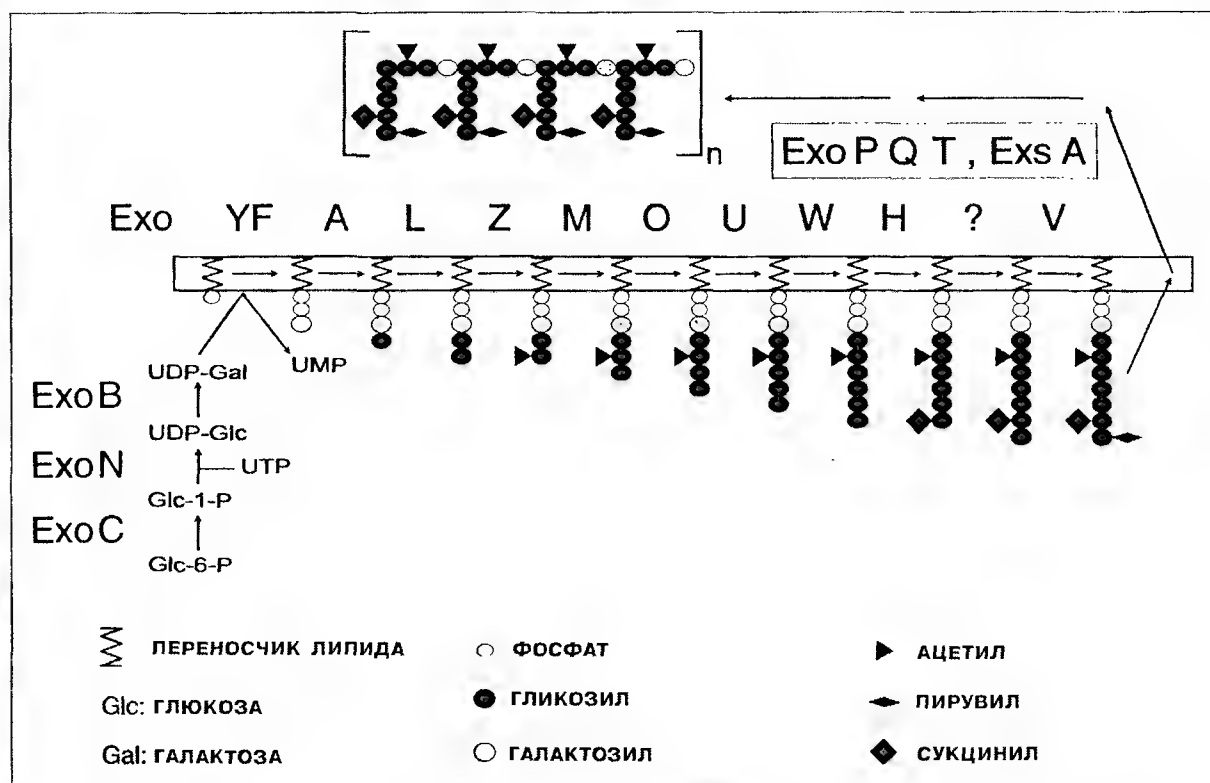


Рисунок 6. Схема биосинтеза сукциноглюкана (ЭПС-I) у штамма SU47 *Sinorhizobium meliloti* (по данным работ: Leigh et al., 1987; Uttaro et al., 1990; Buendia et al., 1991; Reuber, Walker, 1993a, 1993b; Becker et al., 1995a, 1995b).

Белки ExoK и ExsH могут специфически деградировать ЭПС-1 (York, Walker, 1997) и участвуют в образовании низкомолекулярного компонента ЭПС-1.

III.C.2. ЭПС-2

Путь биосинтеза ЭПС-2 пока еще детально не изучен, однако на основе гомологий предсказанных продуктов *exp*-генов могут быть выдвинуты предположения об их функциях (Becker et al., 1997). 4 белка (ExpA7, ExpA8, ExpA9, ExpA10) могут участвовать в формировании dTDP-рамнозы. Первым промежуточным продуктом ее биосинтеза является dTDP-глюкоза, которая может быть предшественником глюкозы для биосинтеза ЭПС-2. В то же время, предшественником ЭПС-1 является УДФ-глюкоза (Reuber, Walker, 1993a), а УДФ-галактоза вовлечена в синтез как ЭПС-1, так и ЭПС-2 (Zhan et al., 1989; Buendia et al., 1991). Использование различных соединений глюкозы в биосинтезе двух форм ЭПС может быть важным для его дифференциальной регуляции у штамма SU47. Хотя Exp-белки, вероятно, вовлечены в более поздние этапы синтеза dTDP-рамнозы, они важны для биосинтеза ЭПС-2, что следует из факта участия dTDP-рамнозы в биосинтезе ЭПС-2. В то же время, этот предшественник не удавалось выявить в супернатантах культуры (Net et al., 1990). Поэтому ЭПС-2 содержит только следы рамнозы, либо этот сахар вовлечен в синтез ЭПС-2, но не содержится в конечном полимере. Рамноза может быть необходима для синтеза праймера старта новой цепи ЭПС-2 или как донор сахара, который добавляется к концу полимера ЭПС-2 для остановки его роста.

exp-гены кодируют 6 потенциальных гликозил-трансфераз. Две из них (ExpA2, ExpE2) могут формировать β -гликозидные связи, тогда как 4 другие (ExpA3, ExpC, ExpE4, ExpE7) - α -гликозидные связи (Becker et al., 1997). Поскольку ЭПС-2 содержит β -1 $\rightarrow$ 3 и α -1 $\rightarrow$ 3 связи, в синтезе ЭПС-2 должна участвовать по меньшей мере одна глицерол-трансфераза формирующая α -гликозидные связи и одна формирующая β -связи.

Белок ExpE1 проявляет гомологию с белком NodO *Rhizobium* (Becker et al., 1997). Эти белки содержат С-терминальный сигнал секреции и выделяются из клеток в окружающую среду. Они обладают кальций-связывающей активностью, а также могут формировать поры в липидных бислоях (Economidou et al., 1990; Sutton et al., 1994), что говорит о возможном участии ExpE1 в экспорте ЭПС-2. Результаты изучения гомологии показывают, что ExpD1 и ExpD2 являются компонентами транспортного комплекса, участвующего в сигнальной пептид-независимой секреции белка, содержащего С-терминальный секреторный сигнал. Мутанты по генам *expE1* и *expE2* имеют нарушения синтеза ЭПС-2 (Glazebrook, Walker, 1989; Becker et al., 1997).

IV. Функции экзополисахаридов ризобий в свободноживущем состоянии и их роль в образовании клубеньков

Свойства и локализация ЭПС, формирующих наружные слои клеточной поверхности, обеспечивают защиту клеток от воздействий среды, поглощение питательных веществ и антигенные свойства. Более того, структурное разнообразие позволяет ЭПС функционировать как сигнальным молекулам в клеточных взаимодействиях. ЭПС играет важную роль в становлении симбиоза ризобий и бобовых, особенно на стадии инвазии клубеньков.

IV.A. ОСМОПРОТЕКЦИЯ

Изменения осмотического давления модифицируют синтез ЭПС у *S. meliloti* (Breedveld et al., 1990b; Zevenhuizen, Faleschini, 1991). Различное соотношение высоко- и низкомолекулярных компонентов ЭПС-1 в зависимости от осмотического давления среды показано для штамма SU47 *S. meliloti*, но не для *A. tumefaciens* (Breedveld et al., 1990b). В отличие от *A. tumefaciens* и различных биотипов *R. leguminosarum*, которые сочетают низкие периплазматические концентрации β -(1,2)-глюканов с формированием капсулы в стационарной фазе, *S. meliloti* не формирует капсулу и поддерживает постоянно высокую концентрацию β -(1,2)-глюканов в периплазме на различных фа-

зах роста (Zevenhuizen, 1981, 1984; Breedveld et al., 1990b). Предполагается, что отложение капсульного материала и высокие периплазматические концентрации β -(1,2)-глюканов могут быть механизмом, обеспечивающим целостность клетки у различных видов *Rhizobiaceae* (Breedveld et al., 1990b). При осмотическом стрессе клетки *R. leguminosarum* (bv. *viceae*, bv. *trifolii*) выбрасывают β -(1,2)-глюканы в окружающую среду (Breedveld et al., 1990a). Для штамма SU47 *S. meliloti* этого показано не было (Breedveld et al., 1990b). Мутанты этого штамма, дефектные по продукции ЭПС-1, секретируют значительные количества β -(1,2)-глюканов (Leigh, Lee, 1988). Это может быть связано с тем, что ЭПС-1 выполняет функцию осмопротекции и секреция β -(1,2)-глюканов мутантами, дефектными по синтезу ЭПС-1, обеспечивает целостность их клеток.

IV.B. ОБРАЗОВАНИЕ КЛУБЕНЬКОВ (ШТАММ SU47 *S. MELILOTI*)

У многих мутантов ризобий, дефектных по синтезу ЭПС, резко нарушена способность формировать эффективный симбиоз. Это особенно ярко проявляется при формировании недетерминированных клубеньков, хотя иногда подобные нарушения выявляют и в случае детерминированных клубеньков, например для ризобий, вступающих в симбиоз с *Astragalus sinicus* (Chen et al., 1996) и некоторых ЭПС-мутантов штамма TAL1145 *Rhizobium* sp., формирующего клубеньки с деревянистыми бобовыми (Parveen et al., 1997). Дефектные по ЭПС мутанты *R. leguminosarum* (биотипы *trifolii* и *viceae*), а также *S. meliloti*, NGR234 *Rhizobium* sp., TAL1145 *Rhizobium* sp., не могут инфицировать своих хозяев, формирующих недетерминированные клубеньки, либо индуцируют клубеньки, лишенные бактерий из-за формирования abortивных инфекционных нитей (Chakravorty et al., 1982; Chen et al., 1985; Finan et al., 1985; Leigh et al., 1985; Borthakur et al., 1986, 1988; Djordjevic et al., 1987; Diebold, Noel, 1989; Bialek et al., 1995; Skorupska et al., 1995; Parveen et al., 1996; Rolfe et al., 1996). ЭПС-мутанты ризобий широкого спектра хозяев, способных нодулировать бобовые с различным типом клубеньков, проявляют на этих растениях различные симбиотические фенотипы. ЭПС-мутанты штамма NGR234 формируют каллусоподобные структуры на бобовом *Leucaena leucocephala*, которое образует недетерминированные клубеньки, хотя нормальные клубеньки - на *Macropodium atropurpureum*, для которого характерна их детерминированная структура (Djordjevic et al., 1987). Кроме того, ЭПС-мутанты *M. loti* образуют детерминированные азотфиксирующие клубеньки на *Lotus pedunculatus* и неэффективные каллусо-подобные структуры на *L. leucocephala* (Hotter, Scott, 1991). Очевидно, что ЭПС не нужен для образования детерминированных клубеньков (Borthakur et al., 1986; Diebold, Noel, 1989; Ko, Gayda, 1990; Hotter, Scott, 1991). Предполагается связь между симбиотическими фенотипами ЭПС-мутантов и различиями в формировании инфекционных нитей в детерминированных и недетерминированных клубеньках (Kijne, 1992). Хотя ЭПС не является необходимым для формирования детерминированных азотфиксирующих клубеньков у *Glycine max*, некоторые стадии их развития при инфицировании ЭПС-мутантом *B. japonicum* нарушены: выявлено замедленное образование клубеньков и сниженная конкурентоспособность (Bhagwat et al., 1991; Kosch et al., 1994; Parniske et al., 1993, 1994; Eggleston et al., 1996).

Таким образом, у ЭПС-мутантов формирование недетерминированных клубеньков нарушено сильнее, чем формирование детерминированных клубеньков. Роль ЭПС в симбиотическом взаимодействии штамма SU47 *S. meliloti* с растениями люцерны изучена подробно.

IV.B.1. Симбиотические свойства мутантов, дефектных по ЭПС

Клубеньки, образованные *exo*-мутантами штамма SU47 на корнях *Medicago sativa*, лишены бактерий и не фиксируют азот (Finan et al., 1985; Leigh et al., 1985). Для образования этих "псевдоклубеньков" характерна сниженная активность скручивания корневых волосков и абортация инфекционных нитей в периферийных клетках (Yang et al., 1992). Псевдоклубеньки более часто развиваются на вторичных корнях, чем на главном корне и лишены дискретной апикальной меристемы, вместо которой обычно присутствует несколько центров митотической активности. На поверхности наблюдаются коричневые некротические зоны, что говорит об активных защитных реакци-

ях (Niehaus et al., 1993). Стенки кортикальных клеток аномально утолщены и инкрустированы автофлуоресцирующим материалом. В отличие от нормальных клубеньков, в клеточных стенках псевдоклубеньков повышено количество фенольных соединений (Niehaus et al., 1993). В этих структурах повышена пероксидазная активность, а также уровни транскриптов фенилаланин-аммоний лиазы (PAL), 3-О-метилтрансферазы (COMT) и изофлавоон-редуктазы (IFR), что говорит о протекании типичных защитных реакций (Niehaus et al., 1993, 1994). Возможно, что именно эти реакции обуславливают нарушение симбиоза. Показано, что снижение продукции этилена растениями *Vicia sativa* ssp. *nigra* обеспечивает инфекцию мутантами *R. leguminosarum* bv. *viciae*, дефектными по синтезу ЭПС (Van Workum et al., 1995). Возможно, этилен индуцирует рост клеток во время инфекции и поэтому ингибирует развитие клубеньков. Замедленное клубенькообразование может выражаться в накоплении этилена и возможно, вызывает дефекты нодуляции и инфекции. Защитные реакции, индуцируемые мутантами *S. meliloti*, дефектными по ЭПС-1, могут быть побочным эффектом продукции этилена, а не первопричиной нарушения клубенькообразования. Мутанты *R. leguminosarum* bv. *viciae*, дефектные по ЭПС и имеющие нарушения в образовании клубеньков на *V. sativa* (Van Workum et al., 1995), характеризуются замедленным скручиванием корневых волосков и формированием инфекционных нитей на *Trifolium repens* и *T. subterraneum* (Rolfe et al., 1996). На последнем из хозяев формировались только “пустые” клубеньки. Если эти виды *Trifolium* продуцируют этилен при инокуляции ЭПС-мутантами, его основной эффект скорее проявляется в развитии тканей клубенька, а не инфекционных нитей.

У мутантов штамма SU47 выявлено замедленное инфицирование долей псевдоклубеньков (Niehaus et al., 1993). Через 6 недель после инокуляции примерно 25% растений имели небольшое количество инфицированных клубеньков, в кортикальных клетках которых выявлялись структуры, похожие на инфекционные нити. В отличие от нормальных инфекционных нитей, эти структуры были более толстыми и окружались плотной стенкой. Возможно, что дефектные по ЭПС-1 мутанты могут преодолевать защитные системы растений люцерны после продолжительной инкубации. Замедленная инфекция обнаружена также у мутантов штамма SU47 по гену *exoH*, который продуцирует несукцинилизированный ЭПС-1, однако эти клубеньки формировались уже через 3-5 недель (Leigh et al., 1987; Leigh, Lee, 1988). Это показывает, что *exoH*-мутанты могут преодолевать защитные реакции растений быстрее, чем мутанты, дефектные по синтезу ЭПС-1. Поскольку у транспозоновых *exoH*-мутантов полностью блокировано образование низкомолекулярного ЭПС-1, оказывается неясным, связано ли недостаточное сукцинилизирование олигосахаридов ЭПС-1 с нарушениями инфекции.

Сверхпродукция ЭПС-1 также может нарушать развитие клубеньков. Хотя *exoX*-мутанты штамма SU47 способны инфицировать клубеньки люцерны (Zhan, Leigh, 1990; Reed et al., 1991a; Muller et al., 1993), соответствующие мутанты по гену *psiA* *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* индуцируют на корнях *Phaseolus* лишь не фиксирующие азот клубеньки (Borthakur et al., 1985). Негативная регуляция синтеза ЭПС-1 на ранних стадиях экспрессии *exo*-генов может быть причиной способности *exoX*-мутанта штамма SU47 индуцировать эффективные клубеньки. В отличие от *exoS*-мутантов, обычно индуцирующих на люцерне азотфиксирующие клубеньки (с некоторым варьированием уровня активности), *exoR*-мутанты штамма SU47, обладающие очень высокой активностью синтеза ЭПС-1, не способны к инфицированию (Doherty et al., 1988; Ozga et al., 1994). Супрессорные мутации в локусе *exoS* позволяют *exoR*-мутантам инфицировать клубеньки благодаря снижению сверхпродукции ЭПС-1 (Ozga et al., 1994). Продукция ЭПС-1 может неблагоприятно влиять на стабильность бактериоидов.

IV.B.2. Роль ЭПС-1 и ЭПС-2 в инвазии клубеньков люцерны

Опыты с совместной инокуляцией показали, что мутанты ризобий, дефектные по *nod*-генам, могут “помогать” мутантам, дефектным по синтезу ЭПС, проникать в клубеньки. Растения *L. leucoserphala*, инокулированные смесью мутанта штамма NGR234 *Rhizobium* sp., лишённого *Sym*-плазмиды, и мутанта по *exo*-генам формировали азотфиксирующие клубеньки, которые содержали клетки обоих мутантов (Chen, Rolfe, 1987; Djordjevic et al., 1987). Сходные результаты получены при совместной инокуляции люцерны мутантами штамма SU47, дефектными по *nod*- и *exo*-генам

(Klein et al., 1988; Puhler et al., 1988; Kapp et al., 1990). Тот факт, что азотфиксирующие клубеньки содержат два типа мутантов, показывают, что оба они участвуют в инфекционном процессе.

В некоторых симбиотических системах добавление очищенного ЭПС восстанавливало способность ЭПС-мутантов инфицировать клубеньки. Это показано для мутантов штамма NGR234 при инфицировании *L. leucocephala* (Djordjevic et al., 1987). Очищенный ЭПС или олигосахариды обеспечивали инвазию клубеньков *Trifolium repens* ЭПС-мутантами *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Добавление гетерологичного ЭПС не восстанавливало инфекционный процесс, что говорит о его специфической функции (Djordjevic et al., 1987). Симбиотический дефект мутантов по ЭПС-1 штамма SU47 может быть преодолен при добавлении низкомолекулярного, но не высокомолекулярного ЭПС-1 (Urzainqui, Walker, 1992; Battisti et al., 1992). Наиболее активным компонентом низкомолекулярной фракции оказался тетрамер, обладающий максимальным зарядом. Поскольку образование *exo*-мутантами клубеньков в присутствии низкомолекулярного ЭПС-1 происходило более медленно, чем у штамма дикого типа, предполагается, что ЭПС-1 функционирует внутри клубеньков или что высокомолекулярный ЭПС-1 может участвовать в инфекционном процессе (Battisti et al., 1992).

Двойные мутанты штамма SU47, у которых блок синтеза ЭПС-1 преодолен за счет супрессорной *expR*-мутации, формировали азотфиксирующие клубеньки на *Medicago sativa*, но не формировали на *M. coerulea*, *M. truncatula*, *Melilotus albus* и *Trigonella founum-graecum* (Glazebrook, Walker, 1989), хотя эти растения формируют активные клубеньки при инокуляции исходным штаммом. Таким образом, взаимозаменяемость ЭПС-1 и ЭПС-2 ограничена клубеньками лишь одного из потенциальных хозяев. В то же время двойной мутант *exoY/mucR* штамма SU47, который продуцировал ЭПС-2 вместо ЭПС-1, формировал на *M. sativa* псевдоклубеньки (Keller et al., 1995). Показано, что *expR*-мутация вызывает синтез высоко- и низкомолекулярных фракций ЭПС-2, тогда как *mucR*-мутант продуцирует только низкомолекулярную фракцию. Симбиотические свойства мутантов штамма SU47, дефектных по синтезу ЭПС-1 и ЭПС-2, могут быть преодолены при добавлении низкомолекулярного, но не высокомолекулярного ЭПС-2. Инвазию клубеньков обеспечивали очищенные субфракции ЭПС-2, содержащие 15-20 повторяющихся единиц (Gonzalez et al., 1996).

Предполагается, что низкомолекулярный ЭПС-1 важен для подавления защитных реакций растений (Niehaus et al., 1993, 1994). Для проверки этой гипотезы в клеточных культурах растения-хозяина *M. sativa*, а также небобовых растений *Nicotiana tabacum* и *Lycopersicon esculentum* изучали синтез возможных элиситоров и супрессоров при добавлении различных веществ (Niehaus et al., 1997). Помимо различных защитных реакций, все культуры реагировали на добавление небольших количеств неспецифических дрожжевых элиситоров сильным и кратковременным повышением щелочной реакции культуральной среды. В клеточной культуре люцерны этот эффект супрессировался добавлением низкомолекулярных фракций ЭПС-1, но не высокомолекулярного ЭПС-1, высокомолекулярного ЭПС-2, а также гетерологичного ЭПС ксантана *Xanthomonas campestris*. Ни одно из этих веществ не снимало эффекта подщелачивания культуральной жидкости у небобовых растений. Эти данные показывают, что низкомолекулярный ЭПС-1 действительно может служить супрессором растительных защитных реакций.

V. Заключение и перспективы

ЭПС являются универсальными молекулами, продуцируемыми многими бактериями, включая Rhizobiaceae. Они важны для многих процессов, связанных с адаптацией бактерий, включая защиту клеток, прикрепление к поверхности и поглощение питательных веществ (Costerson et al., 1987; Sutherland, 1988; Whitfield, 1988; Beveridge, Graham, 1991). Однако, внеклеточные олигосахариды, синтезируемые с участием тех же путей, что и ЭПС, выполняют специфические функции во взаимодействии ризобий с растениями-хозяевами.

Широкое распространение ЭПС говорит о том, что они первоначально возникли у свободноживущих бактерий и лишь позднее приобрели функции, связанные с симбиотическими взаимодействиями. Сложные механизмы регуляции синтеза ЭПС могут отражать разнообразие выполняемых

ими функций. Использование биохимических и генетических подходов позволило детально изучить пути биосинтеза ЭПС у ряда бактерий. Полученные знания, несомненно, помогут в выяснении механизмов синтеза ЭПС и у других микробов. Хотя у ризобий найдено много различных регуляторов, контроль синтеза ЭПС пока еще изучен недостаточно. Дальнейшего изучения требует и действие на синтез ЭПС факторов среды. Выяснение того, как ризобии используют различные структурные особенности ЭПС в свободноживущем и симбиотическом состоянии, поможет глубже понять природу взаимодействий между бактериями и окружающей средой.

VI. Литература

- Aman P., McNeil M., Franzen L.-E., Darvill A.-G., Albersheim P. (1981) *Carbohydr. Res.* V. 95, p. 263-282.
- Amemura A., Harada T., Abe M., Higashi S. (1983) *Carbohydr. Res.* V. 115, p. 165-174.
- An J., Carlson R.W., Glushka J., Streeter J.G. (1995) *Carbohydr. Res.* V. 269, p. 303-317.
- Arias A., Cervensky C. (1986) *J. Bacteriol.* V. 167, p. 1092-1094.
- Astete S.G., Leigh J.A. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 395-400.
- Barnett M.J., Long S.R. (1997) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 10, p. 550-559.
- Battisti L., Lara J.C., Leigh J.A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 89, p. 5625-5629.
- Bayer M.E. (1979) In: M. Inouye (ed.). *Bacterial Outer Membranes: Biogenesis and Functions*, John Wiley & Sons, Inc., NY, USA, p. 167-202.
- Bayer M.E. (1991) *J. Struct. Biol.* V. 107, p. 268-280.
- Becker A., Kleickmann A., Arnold W., Puhler A. (1993a) *Mol. Gen. Genet.* V. 238, p. 145-154.
- Becker A., Kleickmann A., Keller M., Arnold W., Puhler A. (1993b) *Mol. Gen. Genet.* V. 241, p. 367-379.
- Becker A., Kleickmann A., Kuster H., Keller M., Arnold W., Puhler A. (1993c) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 6, p. 735-744.
- Becker A., Kuster H., Niehaus K., Puhler A. (1995b) *Mol. Gen. Genet.* V. 249, p. 487-497.
- Becker A., Niehaus K., Puhler A. (1995a) *Mol. Microbiol.* V. 16, p. 191-203.
- Becker A., Ruberg S., Kuster H., Roxlau A.A., Keller M., Ivashina T., Cheng H.-P., Walker G.C., Puhler A. (1997) *J. Bacteriol.* V. 179, p. 1375-1384.
- Bertram-Drogatz P.A., Quenter I., Becker A., Puhler A. (1997b) *Mol. Gen. Genet.* submitted.
- Bertram-Drogatz P.A., Ruberg S., Becker A., Puhler A. (1997a) *Mol. Gen. Genet.* V. 254, p. 529-5388.
- Beveridge T.J., Graham L.L. (1991) *Microbiol. Rev.* V. 55, p. 684-705.
- Bhagwat A.A., Tully R.E., Kleister D.L. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 57, p. 3496-3501.
- Bialek U., Skorupska A., Yang W.-C., Bisseling T., van Lammeren A.A.M. (1995) *Planta.* V. 197, p. 184-192.
- Bittinger M.A., Milner J.L., Savilla B.J., Handelsman J. (1997) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 10, p. 180-186.
- Borthakur D., Barber C.E., Lamb J.W., Daniels M.J., Downie J.A., Johnston A.W.B. (1986) *Mol. Gen. Genet.* V. 203, p. 320-323.
- Borthakur D., Barker R.F., Latchford J.W., Rossen L., Johnston A.W.B. (1988) *Mol. Gen. Genet.* V. 213, p. 155-162.
- Borthakur D., Downie J.A., Johnston A.W.B., Lamb J.W. (1985) *Mol. Gen. Genet.* V. 200, p. 278-282.
- Borthakur D., Johnston A.W.B. (1987) *Mol. Gen. Genet.* V. 207, p. 149-154.
- Breedveld M.W., Canter Cremers H.C.J., Batley M., Posthumus M.A., Zevenhuizen L.P.T.M., Wijffelman C.A., Zehnder A.J.B. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 750-757.
- Breedveld M.W., Miller K.J. (1994) *Microbiol. Rev.* V. 58, p. 145-161.
- Breedveld M.W., Zevenhuizen L.P.T.M., Zehnder A.J.B. (1990a) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 56, p. 2080-2086.
- Breedveld M.W., Zevenhuizen L.P.T.M., Zehnder A.J.B. (1990b) *J. Gen. Microbiol.* V. 136, p. 2511-2519.
- Brightwell G., Hussain H., Tiburtius A., Yeoman K.H., Johnston A.W.B. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 747-754.
- Buendia A.M., Enenkel B., Koplin R., Niehaus K., Arnold W., Puhler A. (1991) *Mol. Microbiol.* V. 5, p. 1519-1530.
- Bugier A., Geider K. (1995) *Mol. Microbiol.* V. 15, p. 917-933.
- Canter Cremers H.C.J., Batley M., Redmond J.W., Eydems L., Breedveld M.W., Zevenhuizen L.P.T.M., Pees E., Wijffelman C.A., Lugtenberg B.J.J. (1990) *J. Biol. Chem.* V. 265, p. 21122-21127.
- Canter Cremers H.C.J., Batley M., Redmond J.W., Wijffels A.H.M., Lugtenberg B.J.J., Wijffelman C.A. (1991a) *J. Biol. Chem.* V. 266, p. 9556-9564.
- Canter Cremers H.C.J., Stevens K., Lugtenberg B.J.J., Wijffelman C.A., Batley M., Redmond J.W., Breedveld M.W., Zevenhuizen L.P.T.M. (1991b) *Carbohydr. Res.* V. 218, p. 185-200.
- Capage M.A., Doherty D.H., Betlach M.R., Vanderslice R.W. (1987) International patent W087/05938.
- Chakravorty A.K., Zurkowski W., Shine J., Rolfe B.G. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* V. 1, p. 585-596.
- Charles T.C., Finan T.M. (1991) *Genetics.* V. 127, p. 5-20.
- Chen H., Batley M., Redmond J.W., Rolfe B.G. (1985) *J. Plant Physiol.* V. 120, p. 331-349.
- Chen H., Gray J.X., Najjdu M., Djordjevic M.A., Batley M., Redmond J.W., Rolfe B.G. (1988) *Mol. Gen. Genet.* V. 212, p. 310-316.
- Chen H., Long B.-G., Song H.-Y. (1996) *Plant and Soil.* V. 179, p. 217-221.

- Chen H., Rolfe B.G. (1987) *J. Plant Physiol.* V. 127, p. 307-322.
- Cooley M.B., d'Souza M.R., Kado C.I. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 2608-2616.
- Coplin D.L., Cook D. (1990) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 3, p. 271-279.
- Costerton J.W., Cheng K.J., Geesey G.G., Ladd T.I., Nickel J.C., Dasgupta M., Marrie T.J. (1987) *Ann. Rev. Microbiol.* V. 41, p. 435-464.
- Diebold R., Noel K.D. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 4821-4830.
- Djordjevic S.P., Chen H., Batley M., Redmond J.W., Rolfe B.G. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 53-60.
- Djordjevic S.P., Rolfe B.G., Batley M., Redmond J.W. (1986) *Carbohydr. Res.* V. 148, p. 87-99.
- Doherty D., Leigh J., Glazebrook J., Walker G.C. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 4249-4256.
- d'Souza-Ault M.R., Cooley M.B., Kado C.I. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 3486-3490.
- Dudman W.F. (1978) *Carbohydr. Res.* V. 66, p. 9-23.
- Eggleston G., Huber M.C., Liang R., Karr A.L., Emerich D.W. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 419-423.
- Finan T.M., Hirsch A.M., Leigh J.A., Johansen E., Kuldau G.A., Decgan S., Walker G.C., Signer E.R. (1985) *Cell.* V. 40, p. 869-877.
- Finan T.M., Kunkel B., de Vos G.F., Signer E.R. (1986) *J. Bacteriol.* V. 167, p. 66-72.
- Finke A., Bronner D., Nikolaev A.J., Jann B., Jann K. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 4088-4094.
- Freiberg C., Fellay R., Bairoch A., Broughton W.J., Rosenthal A., Perret X. (1997) *Nature.* V. 387, p. 394-401.
- Frosch M., Muller D., Bousset K., Muller A. (1992) *Infection and Immunity.* V. 60, p. 798-803.
- Fukasawa T., Nikaido H. (1961) *Biochim. Biophys. Acta.* V. 48, p. 470-483.
- Glazebrook J., Walker G.C. (1989) *Cell.* V. 56, p. 661-672.
- Glucksmann M.A., Reuber T.L., Walker G.C. (1993a) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 7033-7044.
- Glucksmann M.A., Reuber T.L., Walker G.C. (1993b) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 7045-7055.
- Gil-Serrano A., del Junco A.S., Tejero-Mateo P., Megias M., Cavedes M.A. (1990) *Carbohydr. Res.* V. 204, p. 103-107.
- Gonzalez J.E., Reuhs B.L., Walker G.C. (1996a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 93, p. 8636-8641.
- Gonzalez J.E., York G.M., Walker G.C. (1996b) *Gene.* V. 179, p. 141-146.
- Gray J.X., Djordjevic M.A., Rolfe B.G. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 193-203.
- Gray J.X., Rolfe B.G. (1990) *Mol. Microbiol.* V. 4, p. 1425-1431.
- Gray J.X., Rolfe B.G. (1992) *Arch. Microbiol.* V. 157, p. 521-528.
- Her G.-R., Glazebrook J., Walker G.C., Reinhold V.N. (1990) *Carbohydr. Res.* V. 198, p. 305-312.
- Hisamatsu M., Abe J., Amemura A., Harada T. (1980) *Agric. Biol. Chem.* V. 44, p. 1049-1055.
- Hollingworth R.I., Dazzo F.B., Hallenga K., Musselman B. (1988) *Carbohydr. Res.* V. 172, p. 97-111.
- Hotter G.S., Scott D.B. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 851-859.
- Huang J., Schell M. (1995) *Mol. Microbiol.* V. 16, p. 977-989.
- Hynes M.F., Simon R., Muller P., Niehaus K., Labes M., Puhler A. (1986) *Mol. Gen. Genet.* V. 202, p. 356-362.
- Ielpi L., Couso O., Dankert M.A. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 2490-2500.
- Ivashina T.V., Khmel'nitsky M.I., Shlyapnikov M.G., Kanapin A.A., Ksenzenko V.N. (1994) *Gene.* V. 150, p. 111-116.
- Ivashina T.V., Sadykhov M.R., Chatuev B.M., Dmitriev V.V., Suzina N.E., Duda V.I., Ksenzenko V.N. (1995) In: I.A. Tikhonovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov, W.E. Newton (eds.). *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*, Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, the Netherlands, p. 404.
- Ivashina T., Sadykov M., Senchenkova S., Shashkov A., Shibaev V., Ksenzenko V. (1996) In: A. Wojtowicz, J. Stepkowska, A. Szlagowska (eds.), 2-nd European Nitrogen Fixation Conference & NATO Advanced Research Workshop, Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture. Scientific Publishers OWN, Poznan, Poland, p. 127.
- Kapp D., Niehaus K., Quandt J., Muller P., Puhler A. (1990) *Plant Cell.* V. 2, p. 139-151.
- Keller M., Roxlau A., Weng W.M., Schmidt M., Quandt J., Niehaus K., Jording D., Arnold W., Puhler A. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 267-277.
- Kido N., Torgov V.I., Sugiyama T., Uchiya K., Sugihara H., Komatsu T., Kato N., Jann K. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 2178-2187.
- Kijne J.W. (1992) In: G.S. Stacey, R.H. Burris, J.H.J. Evans (eds.). *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman and Hall, NY, USA, p. 349-398.
- Klein S., Hirsch A.M., Smith C.A., Signer R. (1988) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 1, p. 94-100.
- Ko Y.H., Gayda R. (1990) *J. Gen. Microbiol.* V. 136, p. 105-113.
- Kosch K., Batinic T., Niehaus K., Werner D., Muller P. (1995) In: I.A. Tikhonovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov, W.E. Newton (eds.). *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*, Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, the Netherlands, p. 329.
- Kosch K., Jacobi A., Parniske M., Werner D., Muller P. (1994) *Z. Naturforsch.* V. 49c, p. 727-736.
- Krol J., Janczarek M., Skorupska A. (1996) In: A. Wojtowicz, J. Stepkowska, Szlagowska (eds.), 2-nd European Nitrogen Fixation Conference & NATO Advanced Research Workshop, Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture. Scientific Publishers OWN, Poznan, Poland, p. 126.
- Krol J., Wojcieszuk A., Skorupska A. (1994) In: G.B. Kiss, G. Endre (eds.) *Proc. 1-st European Nitrogen Fixation Conference*, Officina Press, Szeged, Hungary, p. 319.
- Kroncke K.D., Boulnois G., Roberts I., Bitter-Suermann D., Golecki J.R., Jann B., Jann K. (1990a) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 1085-1091.
- Kroncke K.D., Golecki J.R., Jann K. (1990b) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 3469-3472.

- Latchford J.W., Borthakur D., Johnston A.W.B. (1991) *Mol. Microbiol.* V. 5, p. 2107-2114.
- Leigh J.A., Battisti L., Lee C.C., Ozga D.A., Zhan H., Astete S. (1993) In: E.W. Nester, D.P.S. Verma (eds.) *Adv. Molec. Genet. Plant-Microbe Interactions*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, the Netherlands, p. 175-181.
- Leigh J.A., Lee C.C. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 3327-3332.
- Leigh J.A., Reed J.W., Hanks J.F., Hirsch A.M., Walker G.C. (1987) *Cell.* V. 51, p. 579-587.
- Leigh J.A., Signer E.R., Walker G.C. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 82, p. 6231-6235.
- Long S., McCune S., Walker G.C. (1988b) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 4257-4265.
- Long S., Reed J.W., Himawan J., Walker G.C. (1988a) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 4239-4248.
- Lopez-Lara I.M., Orgambide G., Dazzo F.B., Olivares J., Toro N. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 2826-2832.
- Matulova M., Toffanin R., Navarini L., Gilli R., Paoletti S., Cesaro A. (1994) *Carbohydr. Res.* V. 265, p. 167-179.
- May T.B., Chakrabarty A.M. (1994) *Trends Microbiol.* V. 2, p. 151-156.
- May T.B., Shinabarger D., Maharaj R., Kato J., Chu L., DeVault J.D., Roychoudhury S., Zielinski N., Berry A., Rothmel R.K., Mistra T.K., Chakrabarty A.M. (1991) *Clin. Microbiol. Rev.* V. 4, p. 191-206.
- McGrath B.C., Osborn M.J. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 649-654.
- McNeil M., Darvill J., Darvill A.G., Albersheim P., Veen R., Hooykaas P., Schilperoort R., Dell A. (1986) *Carbohydr. Res.* V. 146, p. 307-326.
- Mello A., Glase L. (1965) *J. Biol. Chem.* V. 240, p. 398-405.
- Mimmack M.L., Borthakur D., Jones M.A., Downie J.A., Johnston A.W.B. (1994b) *Microbiology.* V. 140, p. 1223-1229.
- Mimmack M.L., Hong G.F., Johnston A.W.B. (1994a) *Microbiology.* V. 140, p. 455-461.
- Minamisawa K. (1989) *Plant Cell Physiol.* V. 30, p. 877-884.
- Mort A.J., Bauer W.D. (1980) *Plant Physiol.* V. 66, p. 158-163.
- Mort A.J., Bauer W.D. (1982) *J. Biol. Chem.* V. 257, p. 1870-1875.
- Muller P., Hynes M., Kapp D., Niehaus K., Puhler A. (1988) *Mol. Gen. Genet.* V. 211, p. 17-26.
- Muller P., Keller M., Weng W.M., Quandt J., Arnold W., Puhler A. (1993) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 6, p. 55-65.
- Mulligan J.T., Long S.R. (1988) *Genetics.* V. 122, p. 7-18.
- Newcomb W. (1981) In: K.L. Giles, A.G. Atherly (eds.) *Biology of the Rhizobiaceae*. Academic Press, NY, USA.
- Niehaus K., Baier R., Kohring B., Flaschl E., Puhler A. (1997) In: A. Legocki, H. Bothe, A. Puhler (eds.) *Biol. Fixat. Nitrog. Ecol. Sustain. Agric.* Springer Verlag, Heidelberg, Germany, p. 110-114.
- Niehaus K., Kapp D., Lorenzen J., Meyer-Gattermann P., Sieben S., Puhler A. (1994) *Acta Horticulturac.* V. 381, p. 258-264.
- Niehaus K., Kapp D., Puhler A. (1993) *Planta.* V. 190, p. 415-425.
- Osteras M., Stanley J., Finan T.M. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 5485-5494.
- Ozga D.A., Lara J.C., Leigh J.A. (1994) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 758-765.
- Parniske M., Kosch K., Werner D., Muller P. (1993) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 6, p. 99-106.
- Parniske M., Schmidt P.E., Kosch K., Muller P. (1994) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 631-638.
- Parveen N., Webb D.T., Borthakur D. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 364-372.
- Parveen N., Webb D.T., Borthakur D. (1997) *Microbiology.* V. 143, p. 1959-1967.
- Puhler A., Enenkel B., Hillemann A., Kapp D., Keller M., Muller P., Niehaus K., Priefer U., Quandt J., Schmidt C. (1988) In: H. Bothe, F. de Bruijn, W.E. Newton (eds.) *Nitrogen Fixation: Hundred Years After*, Gustav Fischer, NY, USA, p. 423-430.
- Puvanesarajah V., Schell P.M., Gerhold D., Stacey G. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 137-141.
- Reed J.W., Walker G.C. (1991a) *Genes & Development.* V. 5, p. 2274-2287.
- Reed J.W., Walker G.C. (1991b) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 664-677.
- Reed J.W., Capage M., Walker G.C. (1991a) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 3776-3788.
- Reed J.W., Glazebrook J., Walker G.C. (1991b) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 3789-3794.
- Reeve W.G., Dilworth M.J., Tiwari R.P., Glenn A.R. (1997) *Microbiology.* V. 143, p. 1951-1958.
- Reinhold B.B., Chan S.Y., Reuber T.L., Marra A., Walker G.C., Reinhold V.N. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 1997-2002.
- Reuber T.L., Long S., Walker G.C. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 426-434.
- Reuber T.L., Walker G.C. (1993a) *Cell.* V. 74, p. 269-280.
- Reuber T.L., Walker G.C. (1993b) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 3653-3655.
- Rohr T.E., Troy F.A. (1980) *J. Biol. Chem.* V. 255, p. 2332-2342.
- Rolfe B.G., Carlson R.W., Ridge R.W., Dazzo F.B., Mateos P.F., Pankhurst C.E. (1996) *Aust. J. Plant Physiol.* V. 23, p. 285-303.
- Sanchez-Andujar B., Philip-Hollingsworth S., Dazzo F.B., Palomares A.J. (1997) *Mol. Gen. Genet.* V. 255, p. 131-140.
- Shibaev V.N. (1986) *Adv. Carboh. Chem.* V. 44, p. 277-339.
- Skorupska A., Bialek U., Urbanik-Sypniewska T., van Lammeren A. (1995) *J. Plant Physiol.* V. 147, p. 93-100.
- Stevenson G., Andrianopoulos K., Hobbs M., Reeves P.R. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 4885-4893.
- Stingele F., Neesler J.-R., Mollet B. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 1680-1690.
- Streeter J.G., Salminen S.O., Whitmoyer R.E., Carlson R.W. (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 58, p. 607-613.
- Streeter J.G., Salminen S.O., Beuerlein J.E., Schmidt W.H. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 60, p. 2939-2943.
- Sutherland I.W. (1982) *Adv. Microbial Physiol.* V. 23, p. 79-150.
- Sutherland I.W. (1988) *Int. Rev. Cytol.* V. 113, p. 187-231.
- Sutton J.M., Lea E.J.A., Downie J.A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, p. 9990-9994.

- Tiburtius A., de Luca N.G., Hussain H., Johnston A.W.B. (1996) *Microbiology*. V. 142, p. 2621-2629.
- Tolmasky M.E., Stancioni R.J., Ugalde R.A., Leloir L.F. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* V. 203, p. 358-364.
- Tolmasky M.E., Stancioni R.J., Leloir L.F. (1982) *J. Biol. Chem.* V. 257, p. 6751-6757.
- Urzainqui A., Walker G.C. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 3403-3406.
- Uttaro A.D., Cangelosi G.A., Geremia R.A., Nester E.W., Ugalde R.A. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 1640-1646.
- Valla S., Coucheron D.H., Fjaervik E., Kjosbakken J., Weinhouse H., Ross P., Amikam D., Benziman M. (1989) *Mol. Gen. Genet.* V. 217, p. 26-30.
- Vanderslice R.W., Doherty D.H., Capage M.A., Betlach M.R., Hassler R.A., Henderson N.M., Ryan-Graniero J., Tecklenburg M. (1989) In: V. Crescenzi, I.C.M. Dea, S. Paoletti, S.S. Stivala, I.W. Sutherland (eds.). *Biomed. Biotech. Adv. Indust. Polysaccharides* Gordon and Breach, NY, USA, p. 145-156.
- Van Workum W.A.T., van Brussel A.A.N., Tak T., Wijffelman C.A., Kijne J.W. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 278-285.
- Van Workum W.A.T., Canter Cremers H.C.J., Wijffes A.H.M., van der Kolk C., Wijffelman C.A., Kijne J.W. (1997) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 10, p. 290-301.
- Weisgerber C., Troy F.A. (1990) *J. Biol. Chem.* V. 265, p. 1578-1587.
- Whitfield C. (1988) *Can. J. Microbiol.* V. 34, p. 415-420.
- Whitfield C. (1995) *Trends Microbiol.* V. 3, p. 178-185.
- Whitfield C., Valvano M.A. (1993) *Adv. Microbial Physiol.* V. 35, p. 135-246.
- Wong H.C., Fear A.L., Calhoon R.D., Eichinger G.H., Mayer R., Amikam D., Benziman M., Gelfand G.H., Meade J.H., Emerick A.W., Bruner R., Ben-Bassat A., Tal R. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 87, p. 8130-8134.
- Yang C., Signer E.R., Hirsch A.M. (1992) *Plant Physiol.* V. 98, p. 143-151.
- York G.M., Walker G.C. (1997) *Mol. Microbiol.* V. 25, p. 117-134.
- Zevenhuizen L.P.T.M. (1981) *Antonie van Leeuwenhoek*. V. 47, p. 481-497.
- Zevenhuizen L.P.T.M. (1984) *Appl. Microbiol. Biotech.* V. 20, p. 393-399.
- Zevenhuizen L.P.T.M. (1989) In: V. Crescenzi, I.C.M. Dea, S. Paoletti, S.S. Stivala, I.W. Sutherland (eds.) *Biomed. Biotechn. Adv. Industr. Polysacch.* Gordon and Breach, NY, USA, p. 301-311.
- Zevenhuizen L.P.T.M. (1990) In: E.A. Dawes (ed.). *Novel Biodegradable Microbial Polymers*, Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht, the Netherlands, p. 387-402.
- Zevenhuizen L.P.T.M., Faleschini P. (1991) *Carbohydr. Res.* V. 209, p. 203-209.
- Zevenhuizen L.P.T.M., van Neerven A.R.W. (1983) *Carbohydr. Res.* V. 124, p. 166-171.
- Zhan H., Gray J.X., Lavery S.B., Rolfe B.G., Leigh J.A. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 5245-5253.
- Zhan H., Lee C.C., Leigh J.A. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 7391-7394.
- Zhan H., Leigh J.A. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 5254-5259.
- Zhan H., Lavery S.B., Lee C.C., Leigh J.A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 86, p. 3055-3059.

Липополисахариды и К-антигены: структура, биосинтез и функции

Канненберг Э., Реус Б., Форсберг С., Карлсон Р.

I.	Введение.....	143
II.	Липополисахариды (ЛПС).....	145
II.A.	Выделение ЛПС.....	145
II.A.1.	Процедуры экстракции.....	145
II.A.2.	Очистка ЛПС.....	146
II.B.	Структура ЛПС.....	147
II.B.1.	ЛПС <i>Rhizobium leguminosarum</i> и <i>R. etli</i>	147
II.B.2.	Структура ЛПС других представителей Rhizobiaceae.....	149
II.C.	Варьирование структуры ЛПС и филогенетическое родство различных представителей Rhizobiaceae.....	152
II.D.	Биосинтез липида-А у <i>R. etli</i> и <i>R. leguminosarum</i>	153
II.E.	Генетика синтеза ЛПС у <i>Rhizobium</i>	157
II.F.	Структурное варьирование ЛПС ризобий при развитии симбиотических клубеньков.....	157
II.F.1.	ЛПС <i>Rhizobium</i> и его структурные адаптации в клубеньках и у свободноживущих бактерий.....	157
II.F.2.	ЛПС-мутанты ризобий и развитие клубеньков.....	161
II.F.3.	Возможная роль ЛПС в развитии клубеньков.....	164
II.G.	Структурные адаптации ЛПС и другие модели межклеточного взаимодействия.....	167
III.	К-антигены.....	168
III.A.	Группа II К-антигенов.....	169
III.B.	Структуры К-антигенов ризобий и других бактерий, взаимодействующих с растениями.....	169
III.C.	Экспрессия К-антигенов у ризобий.....	170
III.D.	Биология К-антигенов ризобий.....	172
IV.	Заключение.....	173
V.	Благодарности.....	174
VI.	Литература.....	174

I. Введение

Бактериальная поверхность — первая линия защиты против антимикробных молекул и стрессов, вызванных изменениями окружающей среды. В случае взаимодействия микробов с растениями и животными многие молекулы бактериальной клеточной поверхности являются важными детерминантами вирулентности. Поэтому для выяснения молекулярной основы микробно-растительных взаимодействий очень важно охарактеризовать молекулярную архитектуру бактериальной клеточной поверхности и ее модификации в различных условиях, в том числе и *in planta*.

Представители семейства Rhizobiaceae — это грам-отрицательные бактерии, которые часто формируют ассоциации с растениями. Они включают клубенькообразующие симбионты *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, которые в совокупности называют ри-

зобиями, а также *Phyllobacterium* и *Agrobacterium* — опухолообразующие растительные патогены (Jordan, 1984; Young et al., 1996). Наружная поверхность этих бактерий содержит комплекс различных молекул, который включает: липополисахариды (ЛПС), капсульные полисахариды (КПС), циклические глюканы (см. главу 5), внеклеточные полисахариды — ЭПС (см. главу 6), порины, фимбрины и флагеллы. Ризобии также продуцируют дополнительные молекулы, включающие липо-хито-олигосахариды в ответ на растительные сигналы (см. главы 16, 19, 20, 21) и гликозилированные диацилглицерольные молекулы (Cedergren et al., 1996). Практически ничего не известно о поверхностных молекулах *Phyllobacterium*. Некоторая информация о поверхностных молекулах *Agrobacterium* включена в эту главу, но она очень ограничена. Основные сведения, рассмотренные нами, касаются ЛПС и КПС ризобий.

ЛПС — это сложные гликолипидные молекулы, составляющие внешний слой наружной мембраны у грам-отрицательных бактерий. Концептуально ЛПС разделяют на три структурные региона: полисахариды О-цепи, коровые олигосахариды и липидный регион (рис. 1). Полисахариды О-цепи представляют собой полимеризованные повторяющиеся олигосахариды, присоединенные к коровым олигосахаридам ЛПС. Коровые олигосахариды, в свою очередь, присоединены к остаткам глюкозамина (GlcN), представляющим часть липидного региона ЛПС. Остаток 3-деокси-D-манно-2-октулозонозила (Kdo) включен в эту олигосахарид-липидную структуру и его кислотная группировка обусловлена лабильной кето-гликозидной связью. Компонент, обозначенный как липид-А, обычно состоит из дисахаридной структуры, включающей остатки глюкозамина, которые О- и N-ацетилированы жирными кислотами. Район липида-А служит для прикрепления всей молекулы к бактериальной наружной мембране.

Известно 2 типа бактериальных КПС. Один тип состоит из нейтрального полисахарида, который был выделен из штаммов *R. leguminosarum* (Zevenhuisen et al., 1983; Breedveld et al., 1993). Его роль в симбиотическом взаимодействии неясна. Второй тип КПС представлен классом кислых полисахаридов с варьирующей структурой, которые являются полимеризованными олигосахаридами. Общим для большинства из них является присутствие Kdo и его вариантов (Reuhs et al., 1993). Это свойство делает КПС сходным с К-антигенами группы II, выявленными у *Escherichia coli* (Jann

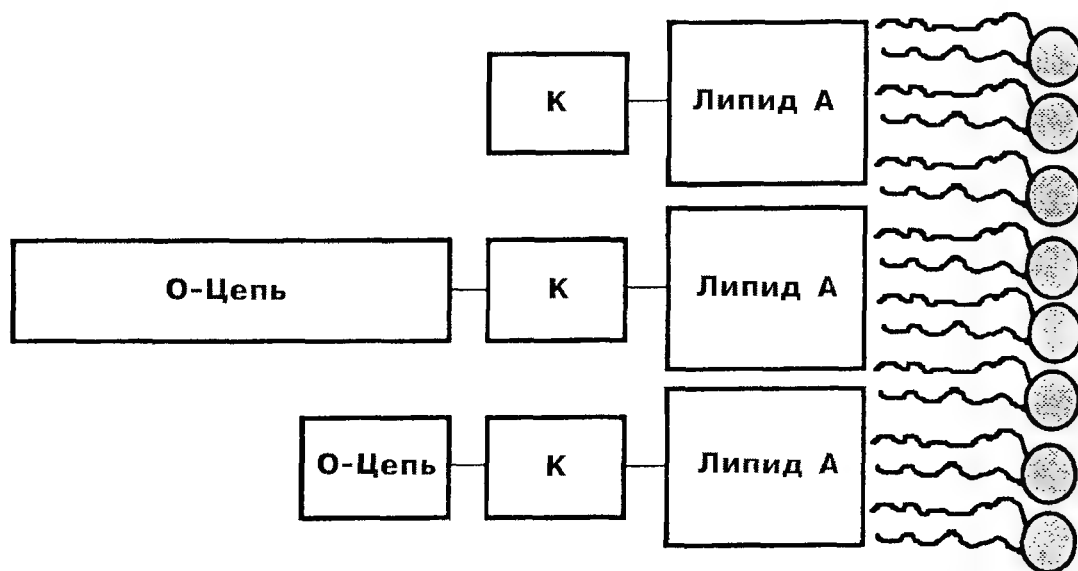


Рисунок 1. Принципиальная схема организации липополисахаридов (ЛПС) грам-отрицательных бактерий. "Гладкий" ЛПС (ЛПС-1) содержит полный набор компонентов, "шероховатый" ЛПС (ЛПС-2) лишен О-цепи или содержит ее редуцированные варианты (ЛПС-3, ЛПС-4 и т.д.). К — коровая часть.

et al., 1990), и поэтому мы будем называть их К-антигенами. Эти антигены найдены у всех проанализированных в данном отношении ризобий, а также и у некоторых патогенных бактерий (Reuhs et al., 1994b). Предполагается, что К-антигены ризобий играют важную роль во взаимодействии с растениями, однако структурные основы этих взаимодействий только начинают проясняться и будут рассмотрены в данной главе.

II. Липополисахариды (ЛПС)

Уже в ранних работах предполагалось, что ЛПС могут играть важную роль во взаимодействии бактерий *Rhizobiaceae* с растениями. На это указывала функциональная важность ЛПС энтеробактерий в инфицировании клеток животных, а также в инфицировании бактерий фагами. Кроме того, ЛПС составляли один из основных компонентов наружной мембраны и уже поэтому были наиболее важными кандидатами на ведущую роль в межклеточных взаимодействиях. Было показано, что ЛПС *Agrobacterium* участвует в прикреплении этих патогенов к клеткам хозяев (Whatley et al., 1970, 1977). Имелись и факты в пользу того, что приращение клеток *Rhizobium* к корням бобовых растений-хозяев определяется взаимодействием растительных лектинов и ризобиальных ЛПС (Wolpert et al., 1976; Kato et al., 1979, 1980, 1981). Приращение ризобий и агробактерий к растительным клеткам будет обсуждаться в главе 11. Последующие работы о бобово-ризобиальных взаимодействиях (см. ниже) показали, что ЛПС участвуют и в более поздних стадиях инфекции.

Хотя ЛПС и играют важную роль в симбиотическом взаимодействии (Noel et al., 1986; Carlson et al., 1987a; Cava et al., 1989; de Maagd et al., 1989; Priefer, 1989; Stacey et al., 1991; Perotto et al., 1994), их конкретная функция остается неизвестной. Некоторые симбиотически дефектные мутанты полностью лишены О-цепи полисахарида. Полная утрата этой части ЛПС приводит к сильному изменению бактериальной поверхности. Поэтому остается неясным, является ли нарушение симбиотических свойств прямым или непрямым результатом данного изменения. Однако последующие работы, проведенные с помощью моноклональных антител на ЛПС бактерий и бактериоидов, показали, что изменения структуры ЛПС происходят в процессе развития симбиоза и эти изменения, по-видимому, связаны с О-цепью полисахаридной части ЛПС (Wood et al., 1989; Sindhu et al., 1990; Tao et al., 1992; Noel, 1992; Noel et al., 1996b; Kannenberg et al., 1992, 1994a, 1994b). Это показывает, что О-цепь ЛПС может непосредственно участвовать в микробно-растительном взаимодействии.

Изменения структуры ЛПС и возможные функции ЛПС в симбиозе обсуждаются в секции II.F. В ближайших разделах мы обсудим очистку, структуру и некоторые аспекты биосинтеза ЛПС у *Rhizobiaceae*.

II.A. ВЫДЕЛЕНИЕ ЛПС

II.A.1. Процедуры экстракции

ЛПС *Rhizobiaceae*, как и ЛПС энтеробактерий, являются сложными соединениями, и единственный препарат ЛПС содержит смесь молекул. Эта смесь обычно содержит молекулы, варьирующие по длине О-цепи полисахарида, корового олигосахарида и липида А, а также молекулы, лишенные О-цепи (рис. 1). Те из них, которые имеют О-цепь, обычно называют "гладкими" (smooth) или ЛПС-1, а лишенные О-цепи - "шероховатыми" (rough) или ЛПС-2. Иногда (например, у некоторых мутантов) выявляют укороченные варианты О-цепи (Carlson et al., 1995), их называют промежуточными или ЛПС-3, ЛПС-4, 5 и т.д. в зависимости от длины О-цепи.

Грубые препараты ЛПС ризобий и агробактерий могут быть получены различными общими методами, разработанными первоначально для очистки ЛПС энтеробактерий. Они включают экстракцию трихлоруксусной кислотой, смесью петролейный эфир/хлороформ/фенол (Galanos et al., 1969) и горячую водно-фенольную методику (Westphal et al., 1965). В настоящее время почти все ЛПС ризобий экстрагируют с использованием последней методики. При повышенной температуре для экстракции используется гомогенная фаза воды и фенола, которая разделяется на две фазы

после охлаждения. Более гидрофобные компоненты оказываются в фенольной фазе, а более гидрофильные — в водной.

Водно-фенольная экстракция штаммов *R. leguminosarum* и *R. etli* обеспечила получение ЛПС как в фенольном, так и в водном слоях. ЛПС из фенольного слоя содержал большее количество длинных цепей жирных кислот, чем ЛПС из водного слоя. Экстракция некоторых ЛПС мутантов, имеющих редуцированную О-цепь, обеспечила выделение ЛПС из обоих слоев, однако в фенольном слое содержалась большая его часть, чем у исходного штамма. ЛПС из *S. meliloti*, *S. fredii* и *A. tumefaciens* также выявляли в обоих слоях, но в основном в водном слое (Carlson et al., 1985; Russa et al., 1991, 1996; Weibgen et al., 1993; Reuhs et al., 1993, 1994a).

ЛПС из *B. japonicum* и *B. elkanii* отличался от ЛПС *Rhizobium* тем, что после водно-фенольной экстракции большая его часть находилась в фенольном слое (Carrion et al., 1990). За исключением штамма USDA110 *B. japonicum*, для представителей всех серогрупп данных бактерий ЛПС обнаруживается исключительно в фенольном слое. Анализ одного из этих ЛПС показал, что его О-цепь сильно О-ацетилирована, причем как О-цепь, так и коровый олигосахарид был лишен заряженных гликозильных остатков, за исключением Kdo (Carrion et al., 1990; Carlson et al., 1992). Поэтому очевидно, что ЛПС *B. japonicum* является сильно гидрофобным, что и обеспечивает его полный переход в фенольную фракцию.

Хотя горячая водно-фенольная методика широко используется для получения грубых препаратов ЛПС, она имеет ряд недостатков. Поскольку обычно изучается водная фаза, некоторые формы ЛПС могут быть утрачены. Для *B. japonicum* и *B. elkanii* ЛПС экстрагируются исключительно в фенольную фазу, что осложняет их последующую очистку. Для некоторых мутантов, имеющих редуцированную О-цепь, водно-фенольная экстракция оказалась малоэффективной. В то же время, для структурных и биологических исследований часто оказывается важным получить большие количества ЛПС. Водно-фенольная экстракция 100–400 л бактериальной культуры может оказаться очень сложной и даже опасной из-за большого количества необходимого фенола.

Поэтому в последние годы были предложены новые методики экстракции. Большие количества всех форм ЛПС ризобий и агробактерий могут быть экстрагированы путем простого перемешивания клеточного осадка в растворе EDTA-триэтанол-амин (TEAoL) (pH=7) или EDTA-триэтиламина (TEA) (pH=7) в течение 30–60 минут при комнатной температуре. Экстракция с помощью EDTA-TEA улучшается при добавлении 5% фенола и повышении температуры до 60°C. Эта быстрая и простая процедура позволяет обрабатывать большие количества бактерий, но может использоваться и малом масштабе для выявления минорных различий в структуре ЛПС (Valverde et al., 1997).

II.A.2. Очистка ЛПС

После того, как путем экстракции получен грубый препарат ЛПС, он подлежит дальнейшей очистке. Для этого используют различные методы, выбор которых зависит от вида бактерий.

Гель-фильтрационная хроматография с использованием сефарозы 4В в буфере EDTA-TEA используется для очистки ряда ризобияльных ЛПС, например ЛПС *R. leguminosarum* (Carrion et al., 1990; Carlson et al., 1992). Этот метод позволяет отделить ЛПС от примеси внеклеточного ЭПС и от низкомолекулярных углеводов, например, от циклических β -2-связанных глюканов.

Фильтрация в геле сефарозы 4В была использована также для очистки ЛПС *S. meliloti* и *S. fredii*. Однако грубые препараты ЛПС были загрязнены большим количеством Kdo-богатых К-антигенов, которые не удалось полностью отделить с помощью данной процедуры (Reuhs et al., 1993). Одним из методов, позволяющих надежно отделить ЛПС от К-антигенов, является гель-фильтрационная хроматография на сефадексе G-150 в присутствии буфера, содержащего 1% дезоксихолат (DOC) (Reuhs et al., 1993). Это обеспечивает де-агрегацию ЛПС и, следовательно, позволяет отделить относительно более крупный К-антиген. Интересно, что эта процедура позволяет разделять ЛПС различной молекулярной массы, например, отделять ЛПС-1 от ЛПС-2 (Reuhs et al., 1994a).

Препаративный гель-электрофорез — другой метод очистки ЛПС (Kim et al., 1996b). Он позволяет: а) отделить ЛПС от К-антигена или других типов КПС у различных бактерий; б) отделить КПС от липид-связанных КПС; в) разделять дискретные по размеру классы КПС, К-антиге-

нов и ЛПС. С его помощью могут быть выделены и дискретные классы ЭПС. Для препаративного гель-электрофореза может быть достаточным всего 100 мг грубого экстракта ЛПС. Первоначально образец подвергается электрофорезу в отсутствие ДОС. При этом ЛПС остается крупномолекулярным агрегатом и не входит в разделяющий гель. Однако, кислый К-антиген или КПС мигрируют сквозь гель и элюируют из него. После элюции К-антигена в буфер электрофореза добавляют ДОС. Он де-агрегирует ЛПС, который затем мигрирует сквозь гель и разделяется на фракции с различным размером.

Наиболее удобным и эффективным методом получения высокоочищенных ЛПС *Rhizobium* является афинная хроматография на колонках, содержащих полимиксин-агарозу. Полимиксин представляет собой ацилированный циклический пептидный антибиотик, который активно связывается с липидом А из ЛПС (Morrison et al., 1976; David et al., 1992). Грубые экстракты, полученные при любой из описанных выше процедур, могут быть нанесены на такую колонку. После нанесения образца колонка с полимиксином последовательно элюируется растворами с возрастающей ионной и хаотропической силой для того, чтобы элюировать компоненты, не являющиеся ЛПС и связанные неспецифическими слабыми взаимодействиями. Когда все посторонние компоненты элюируют из колонки, ее промывают 1% ДОС или сильным хаотропным раствором (например, 4 М гуанидином) для того, чтобы смыть ЛПС. Электрофорез элюированных ЛПС в полиакриламидном геле в присутствии ДОС показывает полное отсутствие компонентов, не являющихся ЛПС.

Очищенный ЛПС, получаемый в результате полимиксин-афинной хроматографии, часто более чист, чем ЛПС, получаемый стандартными методами гель-фильтрации. Все изученные ЛПС *Rhizobiaceae* (*R. etli*, *R. leguminosarum*, *S. meliloti*, *S. fredii*, *Rhizobium* sp., *Agrobacterium*) связываются с полимиксин-агарозой. Эти полимиксин-очищенные препараты состоят из смеси различных по размеру ЛПС, имеющих у бактерии. Смешанный ЛПС может быть очищен с использованием одной из описанных методик.

Сочетание упрощенной процедуры экстракции с использованием EDTA-TEAoL или EDTA-TEA и полимиксин-афинной хроматографии позволяет очистить ЛПС в две стадии. При этом могут быть использованы как большие, так и малые количества ЛПС (Valverde et al., 1997).

II. В. СТРУКТУРА ЛПС

Определение структуры ЛПС *Rhizobiaceae* в целом производится с помощью тех же методов, которые используют для энтеробактерий и при изучении разных гликоконъюгатов. Структурная характеристика включает определение: а) состава гликозидов и жирных кислот, б) гликозидных связей, в) аномерных и стереохимических конфигураций гликозила, г) последовательности гликозидных остатков и локализацию жирнокислотных замещающих групп. Этот анализ требует использования комбинированной газо-жидкостной хроматографии (GLC) и масс-спектрометрии (MS), спектроскопии ядерно-магнитного резонанса (NMR) и методик MS, таких как бомбардировка быстрыми атомами (FAB-MS), электроскопия-ионизация (ESI-MS) и лазерное определение времени полета с помощью матриц (MALDITOF-MS).

Благодаря сложности и структурной гетерогенности ЛПС, изучение их структуры сталкивается с рядом проблем. Наиболее сложен анализ ЛПС *Rhizobium*, в которых отсутствуют некоторые компоненты, характерные для ЛПС энтеробактерий и которые содержит много редко встречающихся или лабильных сахаров в нестандартных позициях. Тем не менее, ЛПС всех проанализированных видов *Rhizobiaceae* имеют общие структурные мотивы с ЛПС энтеробактерий: структурное и функциональное разделение на три региона: полисахаридная О-цепь, олигосахаридный коровый район и липид-А (рис. 1).

II. В. 1. ЛПС *Rhizobium leguminosarum* и *R. etli*

Наиболее подробно изучены ЛПС *R. leguminosarum* и *R. etli*. О-цепи *R. leguminosarum* сильно различаются у разных штаммов и состоят из дезокси- и метилированных дезоксигликозидных остатков, а также из остатков уроновых кислот и иногда из остатков гептозила (Carlson et al., 1978; 1987a, 1987b; Carlson, 1984; Wang et al., 1994). Эти О-цепи состоят из повторяющегося

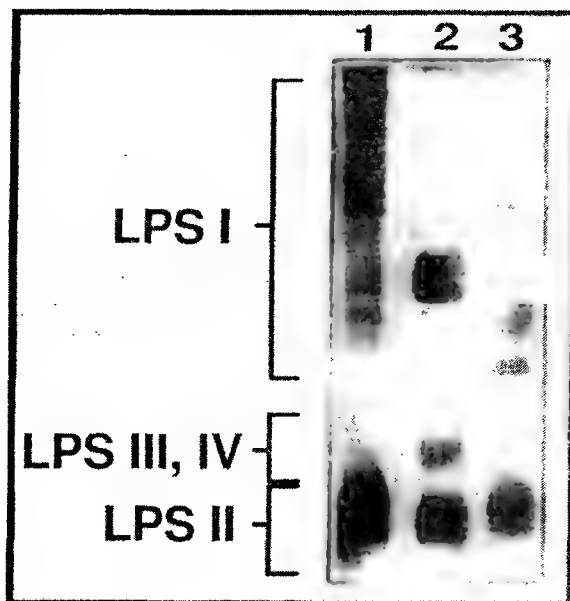


Рисунок 2. Анализ липополисахаридов путем электрофореза в полиакриламидном геле (PAGE). 1 — *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, штамм I28C53; 2 — *R. etli*, штамм CE3, 3 — *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, штамм ANU843 (структуры разных форм ЛПС приведены на рисунке 1).

олигомеризованного олигосахарида. На рисунке 2 представлены профили различных ЛПС *R. leguminosarum* и *R. etli*, изученные с помощью PAGE. У некоторых штаммов число повторов в О-цепи сильно варьирует и PAGE-анализ дает “ступенчатые” профили. Для других штаммов число повторов варьирует слабо, и PAGE-анализ показывает лишь несколько главных полос (Carlson, 1984; Carlson et al., 1983, 1987a, 1987b). Интересно, что О-цепи *R. leguminosarum*, выделенные после мягкого кислотного гидролиза, имеют остатки Kdo на редуцирующих концах, что не характерно для энтеробактерий. Структуры цепей штаммов *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *R. leguminosarum* bv. *viceae* и *R. etli* представлены в таблице 1. У штамма CE3 *R. etli* (ранее *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*) повторяющаяся единица О-цепи состоит из глюкуроновой кислоты (GlcA), фукозы (Fuc) и 3-О-метилрамнозы (3MeRha) (Carlson et al., 1987a). Даже в присутствии GlcA О-цепь, выделенная после мягкого кислого гидролиза ЛПС, не связывается на колонке DEAE при pH=8.0, что говорит о нейтральности молекулы. Следовательно, карбоксильная группа GlcA должна быть модифицирована таким образом, чтобы обеспечить нейтральность, т.е. GlcA может быть модифицирована в глюкуронамидный остаток. Изучение других структур важно тем, что присутствие О-цепи необходимо для нормального морфогенеза клубеньков, а в процессе развития симбиоза происходят модификации О-цепи (раздел II.F.).

Полная структура корового района липида А штамма CE3 *R. etli* представлена на рисунке 3. Гликозильный компонент состоит из Kdo, глюкозамина, 2-аминоглюконата (GlcNonate), маннозы (Man), галактозы (Gal) и галактуроновой кислоты. Для двух коровых олигосахаридов, освобождаемых при мягком кислотном гидролизе лабильных гликозидов Kdo, были определены структурные связи. Они включают α -D-GalA-1 $\rightarrow$ 5[(α -D-GalA-1 $\rightarrow$ 4)]-Kdo трисахарид и α -D-Gal-1 $\rightarrow$ 6[α -D-GalA-1 $\rightarrow$ 4]- α -D-Man-1 $\rightarrow$ 5-Kdo тетрасахарид (Carlson et al., 1990; Bhat et al., 1991a). Идентичные олигосахариды были выявлены в ЛПС *R. leguminosarum* bv. *trifolii* и *R. leguminosarum* bv. *viceae* (Carlson et al., 1988; Hoollingsworth et al., 1989b, 1990, 1994; Zhang et al., 1992). Важно отметить, что 3-дезоксигептулозаровая кислота также выявлена в коровом районе некоторых штаммов *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Russa et al., 1991).

Липид-А из штамма СЕЗ *R. etli* был выделен при мягком кислотном гидролизе и структурно охарактеризован (Bhat et al., 1994). По сравнению с другими бактериями он имеет очень необычную структуру. Этот липид А лишен фосфата, не имеет ацилоксиацил-замещений, содержит только гидроксигирные кислоты, включая высокомолекулярную 27-гидроксиоктакозониновую кислоту (27-ОНС28:0) (Hollingsworth et al., 1989a), в положении 4' находится остаток GalA вместо фосфата, а 2-аминоглюконат — в положении GlcN-1-фосфата. Кроме того, в отличие от липида А энтеробактерий, в котором заместителем N-ацила является исключительно β-гидроксимиристант, липид-А *R. etli* содержит GlcN, который гетерогенно N-ацилирован β-гидроксимиристантом, β-гидроксипальмитатом, либо β-гидроксистеаратом (Bhat et al., 1991c, 1994).

Организация коровых олигосахаридов и точка прикрепления О-цепи в ЛПС были определены путем анализа мутантов, у которых либо полностью отсутствует О-цепь, либо она резко укорочена (Carlson et al., 1995; Forsberg, Carlson, 1997) (рис. 3). Важно отметить, что препараты ЛПС представлены гетерогенной смесью молекул на различных стадиях завершенности биосинтеза. Поэтому препарат ЛПС, лишенный О-цепи, содержит различные коровые структуры, лишенные остатков гексозы или тексуринозила (Forsberg, Carlson, 1997). Полная структура молекулы ЛПС, содержащей полисахарид О-цепи, представлена на рисунке 3. Химический анализ ЛПС *R. etli* показал, что полисахарид О-цепи прикреплен к галактозильному остатку в коровом регионе, то есть к “тетрасахаридному” коровому элементу. Поэтому любое нарушение в этом участке кора приводит к образованию “шероховатого” ЛПС. Это было показано для *R. etli* (Carlson et al., 1995) и *R. leguminosarum* bv. *viceae* (Zhang et al. 1992; Hollingsworth et al., 1994).

То, что галактозильный остаток является точкой прикрепления О-цепи в ЛПС *R. leguminosarum*, подтверждается тем, что *exoB*-мутант, дефектный по УДФ-галактозо-эпимеразе, лишен полисахарида О-цепи ЛПС (Van Workum et al., 1995). Установлено, что ЛПС штамма 4S *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, лишенный тетрасахаридной части в коровом регионе, не имеет О-цепи полисахарида (Cederberg et al., 1996). В этой же работе показано, что у данного штамма полисахарид О-цепи прикреплен к диацилглицерольному кольцу, а не к коровому региону ЛПС.

II.B.2. Структура ЛПС других представителей *Rhizobiaceae*

Структура ЛПС у *Agrobacterium* изучена слабо. Однако известно, что биотипы 1 и 2 *A. tumefaciens* содержат О-цепи, обогащенные рамнозой. PAGE-анализ показал, что биотип 3 имеет “шероховатый” ЛПС, лишенный полисахарида О-цепи (Weibgen et al., 1993).

В дополнение к указанным выше структурам, была изучена О-цепь ЛПС штамма CIAT899 *R. tropici* (Gil-Serrano et al., 1995) (табл. 1). Как и в случае О-цепей *R. etli* и *R. leguminosarum*, эта структура содержит повторяющийся олигосахарид, богатый дезоксигексозами. Фактически состав многих ризобийных О-цепей показывает что они богаты дезоксигексозами и метилированными дезоксигексозами и могут также содержать 6-дезоксигексозами и N-метилированные 6-дезоксигексозами (Carlson, et al., 1978; Zevenhuizen et al., 1980; Carlson, 1982, 1984; Glowacka et al., 1986; Carrion et al., 1990; Weibgen et al., 1993; Russa et al., 1995; Gil-Serrano et al., 1995). Кроме того, использование метода ЯМР показало, что О-цепи могут быть сильно ацетилированы (Carrion et al., 1990; Bhat et al., 1992; Gil-Serrano et al., 1995). Поэтому О-цепи ЛПС ризобий могут быть в отношении полисахарида весьма гидрофобны. О-цепи ЛПС *B. japonicum* и *B. elkanii*, которые также содержат дезоксигексозами, сильно ацетилированы и, как уже говорилось, в достаточной степени гидрофобны для того чтобы быть выделенными в фенольном слое при водно-фенольной экстракции (Carrion et al., 1990; Bhat et al., 1992).

О-цепи многих видов *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* являются основными антигенными детерминантами. При получении антител против этих бактерий большинство из них оказываются активными против О-цепи полисахарида (Carlson et al., 1987a, 1987b; Carrion et al., 1990). Обычно имеется лишь слабая реакция на “шероховатые” ЛПС, лишенные О-цепи (Lucas et al., 1996).

О-цепи *S. fredii*, *S. meliloti* и *Rhizobium* sp. NGR234 отличаются от О-цепей *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*. Часто они являются гомополимерами, например глюканами (Reuhs et al., 1994a). Кроме того, у этих видов коровый олигосахарид является основным антигенным районом ЛПС (Reuhs et al., 1993, 1995; Petrovics et al., 1993), т.к. антисыворотка на эти бактерии сильно реаги-

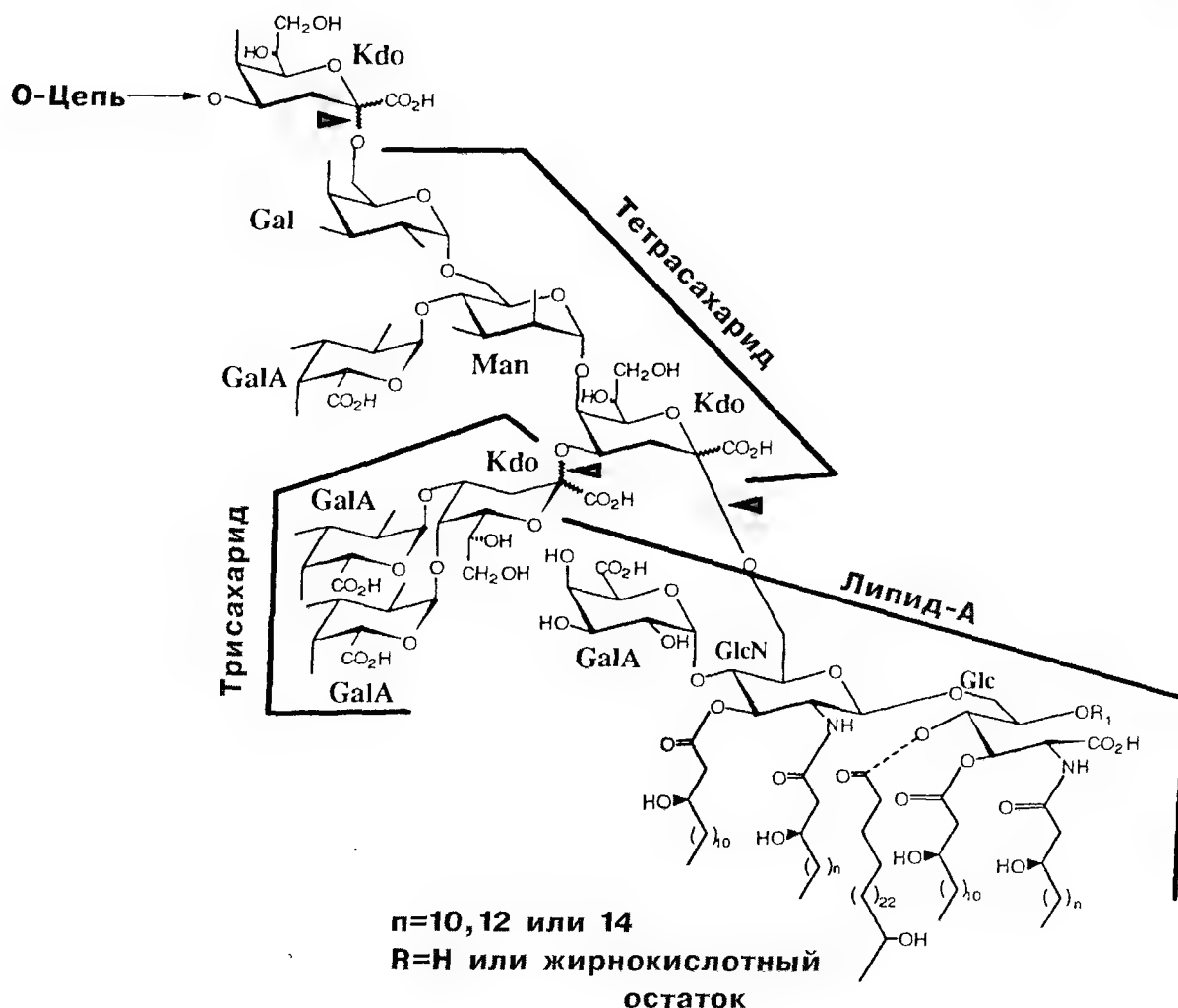


Рисунок 3. Структура корового олигосахарида липида-А *Rhizobium etli*, СЕЗ. Волнистые линии в структуре Kdo означают, что аномерные конфигурации соответствующих связей не известны (хотя по аналогии со структурами Kdo других бактерий можно предполагать наличие альфа-связей). Кислотолабильные связи указаны стрелками. Kdo - 3 дезокси-D-манно-2-октулозонозил, Gal - галактоза, GalA - галактуроновая кислота, Man - манноза.

рует с “шероховатым” ЛПС. Эти результаты показывают, что О-цепи данных видов не являются сильно антигенными или что соотношение “гладкой” и “шероховатой” форм ЛПС значительно ниже, чем это наблюдают у видов *R. leguminosarum*, *R. etli* и *Bradyrhizobium*. Поэтому высокое содержание “шероховатого” ЛПС на клеточной поверхности *S. meliloti*, *S. fredii* и *Rhizobium* sp. NGR234 делает его доминирующим антигеном. Это же характерно и для *R. galegae* (Lipsanen et al., 1989) – вида, таксономическое положение которого недостаточно ясно.

Охарактеризованы коровые олигосахариды и некоторых других ризобий. У штамма 61A101c *B. elkanii* коровый регион состоит из двух олигосахаридов: α -4-O-MeMan-(1→5)-Kdo дисахарида и α -Man-(1→4)- α -Glc-(1→4)-Kdo трисахарида. Эти олигосахариды освобождаются при мягком кислотном гидролизе ЛПС мутантов, лишенных полисахарида О-цепи (Carlson et al., 1992). Из ЛПС родительского штамма освобождаются только трисахариды и О-цепь, содержащая 4-O-MeMan. Поэтому возможно, что полисахарид О-цепи связан с остатком 4-O-MeMan корового региона. В

Таблица 1. Структура О-цепей полисахаридов ризобий. Glc — глюкоза, Man — манноза, ManNAc — N-ацетилманнозамин, Rha — рамноза, Tal — талоза, GlcA* — модифицированная нейтральная глюкуроновая кислота, Fuc — фукоза, Me — метил, Ac — ацетил.

Штамм	Структура	Ссылка
<i>R. leg. bv. trifolii</i> 4S	→3)- α-L-Rha-(1→3)- α-L-Rha-(1→4)- β-D-GlcNAc-(1→3)- α-L-Rha-(1→ 2) ↑ α-D-ManNAc-(1	Wang <i>et al.</i> , 1994
<i>R. leg. bv. viceae</i> 128C53	→3)- α-L-Rha-(1→3)- α-L-Fuc-(1→3)- α-L-Fuc-(1→ 2) ↑ α-D-Man-(1	Chen, 1987
<i>R. etli</i> CE3	→4)- β-D-GlcA*-(1→4)- α-L-Fuc-(1→ 3) ↑ α-3-O-MeRha-(1)	Forsberg <i>et al.</i> , in preparation
<i>R. tropici</i> CIAT899	→4)- β-D-Glc-(1→3)- α-D-2-O-Ac-6-deoxy-Tal-(1→3)- α-L-Fuc-(1→	Gil-Serrano <i>et al.</i> , 1995

отличие от ЛПС *R. leguminosarum*, ЛПС *B. elkanii* не содержит в коровом регионе кислых сахаров, за исключением Kdo.

“Гладкие” и “шероховатые” ЛПС из *R. fredii* могут быть разделены, и анализ вторых показал, что их коровый район состоит из Kdo, Glc, Gal, GalA, GlcA (Reuhs *et al.*, 1994a). Места присоединения и последовательность этих гликозильных остатков не были определены. Профили, полученные путем анионной обменной хроматографии с высоким разрешением (НРАЕС) показали высокое сходство “гладкого” и “шероховатого” ЛПС, что говорит об идентичности их коровых структур (Reuhs *et al.*, 1994a). При этом оказалось, что коровые регионы различных штаммов *S. fredii* имеют общий набор олигосахаридов, а также и второй их набор, который варьирует от штамма к штамму (рис. 4В, обсуждение ниже).

ЛПС *Sinorhizobium meliloti* и *Rhizobium* sp. NGR234 имеют коровые регионы, весьма сходные с *S. fredii* (см. следующий раздел). В коровом районе ЛПС *S. meliloti* содержится необычный сахар, 3-дезоксигептулозаровая кислота (Russa *et al.*, 1991, 1996), которая обычно присутствует в компоненте растительной клеточной стенки, называемом рамногалактуронаном II (Stevenson *et al.*, 1988). Этот сахар найден также в коровом компоненте ЛПС *Agrobacterium* (Weibgen *et al.*, 1993). У *S. meliloti* данный компонент сульфатирован (Cedergren *et al.*, 1995). Это может быть связано с наличием у *S. meliloti* нескольких наборов генов, контролирующих сульфатацию, в дополнение к генам *nodP*, *nodQ*, *nodH*, ответственным за сульфатацию липо-хито-олигосахаридных Nod-факторов (Schwedock *et al.*, 1992).

Липиды А из ЛПС варьируют по структуре у разных видов ризобий. Гликозильный состав различных регионов липида-А представлен в таблице 2. В дополнение к описанному выше липиду-А *R. leguminosarum*, липид-А *S. meliloti* состоит из ацилированного бис-фосфорилированного дисахарида глюкозамина, сходного с тем, который был обнаружен у многих энтеробактерий (Urbanik-Sypniewska *et al.*, 1989). Липид-А *B. japonicum*, *B. elkanii*, *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*), *M. loti* содержат 2,3-диаминоглюкозу (Mayer *et al.*, 1989b; Russa *et al.*, 1995). Липид А у *B. elkanii* также содержит маннозу (данные авторов), а у *M. loti* он фосфорилирован (Russa *et al.*, 1995). Детально гликозильный состав липида А *Agrobacterium* не описан, однако анализ интактного ЛПС показал присутствие глюкозамина (Weibgen *et al.*, 1993).

Таблица 2. Гликозильные компоненты липида А у бактерий Rhizobiaceae

Группа	Вид	GlcN	DAG	Man	GalA	2-Gl	Pho	Ссылки
I	<i>S. meliloti</i>	+	-	-	-	-	+	Urbanik-Sypniewska et al., 1989
	<i>S. fredii</i>	+	-	-	-	-	nd	Bhat et al., 1991c
II	<i>R. leg. bv. trifolii</i>	+	-	-	+	+	-	Bhat et al., 1991c
	<i>R. leg. bv. viceae</i>	+	-	-	+	+	-	Bhat et al., 1991c
	<i>R. etli</i>	+	-	-	+	+	-	Bhat et al., 1991c, 1994
III	<i>B. japonicum</i>	-	+	-	-	-	-	Mayer et al., 1989b
	<i>B. sp. (Lupinus)</i>	-	+	-	-	-	-	Mayer et al., 1989b
IV	<i>B. elkanii</i>	-	+	+	-	-	nd	Данные авторов
V	<i>M. loti</i>	-	+	-	-	-	+	Russa et al., 1995

GlcN — глюкозамин, DAG — 2,3-диаминоглюкоза, Man — манноза, GalA — галактуроновая кислота, 2-Gl — 2-аминоглюконат, Pho — фосфат, nd — нет данных.

Типы жирных кислот, найденные в липидах А ризобий, могут сильно различаться у разных видов (Russa et al., 1985; 1995; Mayer et al., 1989b; Bhat et al., 1991c). Обычно преобладают β-гидрокси-жирные кислоты, 27-гидроксиоктакозановая кислота, а также выявлены небольшие количества различных насыщенных и моно-ненасыщенных жирных кислот. Некоторые липиды А содержат небольшие количества оксо-жирных кислот (Russa et al., 1995).

II.C. ВАРЬИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ЛПС И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РОДСТВО РАЗЛИЧНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ RHIZOBIACEAE

Детали структуры корового региона и липида А используют для уточнения филогенетических отношений у разных бактерий (Mayer et al., 1984, 1989a, 1990; Bhat et al., 1991b; Neumann et al., 1995). Филогения, построенная на основе последовательностей 16S или 5S рРНК, обычно коррелирует со структурой липида-А. Поэтому сравнение структуры ЛПС у различных представителей Rhizobiaceae с известными филогенетическими отношениями представляет большой интерес.

Одним из последних достижений в изучении ЛПС стало выяснение того факта, что липид А *R. leguminosarum* bv. *trifolii* содержит, в дополнение к другим жирнокислотным остаткам, очень длинную жирную кислоту, 27-ОНС28:0 (Hollingsworth et al., 1989a), которая затем была найдена и у других представителей Rhizobiaceae за исключением *A. caulinodans* (последнее требует перепроверки) (Bhat et al., 1991c). Поскольку на основании гомологии 16S рРНК показано, что семейство Rhizobiaceae входит в альфа-подкласс протеобактерий (Woese, 1987), были изучены липиды А и у других членов этой группы, включая фототрофные, нитрифицирующие, клубенькообразующие и внутриклеточные бактерии, в том числе патогены растений и животных. Липид А, содержащий 27-ОНС28:0, был выделен из *Rhodopseudomonas viridis*, *R. palustris*, *Nitrobacter winogradskyi*, *N. hamburgensis*, *Oligotropha carboxydovorans* (ранее *Pseudomonas carboxydovotans*), *Brucella abortus*, *Afpia felis* (ранее известна как бактерия, связанная с болезнью “кошачьих царапин”), *A. tumefaciens*, *A. radiobacter*, *A. rhizogenes* и *Thiobacillus* spp. (Bhat et al., 1991b).

Изучение гликозильных остатков, найденных в различных липидах А ризобий, выявило варьирование компонентов, различающихся в соответствии с филогенетическим положением (табл.

2). В соответствии с этими данными, изученные виды Rhizobiaceae могут быть разделены на 5 кластеров: (1) *S. meliloti*, *S. fredii*; (2) *R. leguminosarum* (bv. *trifolii*, *viciae*, *phaseoli*), *R. etli*; (3) *B. japonicum*, *B. sp.* (*Lupinus*); (4) *B. elkanii*; (5) *M. loti*. Это распределение соответствует результатам других филогенетических исследований (Jarvis et al., 1992; Yanagi et al., 1993; Young et al., 1996; Martinez-Romero et al., 1996). Единственным исключением является недавно реклассифицированный штамм *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CE3, включенный в состав *R. etli* (Segovia et al., 1993). Липиды А *R. leguminosarum* (bv. *trifolii*, bv. *viciae*) и штамма CE3 *R. etli* не только имеют сходный гликозильный состав, но и общую структуру, представленную на рис. 3. По липиду А *Agrobacterium* информации получено еще недостаточно для того, чтобы включить ее в общую схему (табл. 2).

Связь между структурой ЛПС и филогенией была подтверждена также путем сравнения коровых олигосахаридных районов. В этом случае выявляемые подгруппы те же, что и в случае состава липида А. Путем НРАЕС-анализа ЛПС, гидролизованного мягким кислотным методом, показано, что обычно присутствуют только коровые олигосахариды, так как полисахариды О-цепей элюируются в пустой объем или, при наличии кислотных свойств, намного позднее, чем коровые олигосахариды. На рисунке 4А представлены коровые профили, полученные методом НРАЕС у штаммов CE3 *R. leguminosarum* bv. *viciae*, ANU843 *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, которые оказались идентичными. Для этих профилей была определена структура каждого НРАЕС-пика (Carlson et al., 1995). У всех изученных штаммов *R. leguminosarum* и *R. etli* коровый район ЛПС состоит из тетра- и трисахаридов (Carlson et al., 1988; Hollingsworth et al., 1990, 1994; Bhat et al., 1991a; Zhang et al., 1992), описанных выше и организованных так, как представлено на рис. 3. Единственным исключением является ЛПС штамма 4S *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, в котором отсутствует тетрасахаридный компонент кора, а также полисахарид О-цепи (Cedergren et al., 1996). Даже при отсутствии данных о коровых олигосахаридах других ЛПС ризобий, такой НРАЕС-анализ может быть использован для сравнения коровых регионов различных ЛПС. На рисунке 4В представлены НРАЕС-профили штаммов USDA205 *S. fredii*, Rm1021 *S. meliloti*, NGR234 *Rhizobium* sp. Они оказались иными, нежели профили *R. leguminosarum*, но сходными между собой тем, что имеются общие для них олигосахариды. Наличие олигосахаридов, общих для данных видов, подтверждают ранние работы (Elkan, 1992; Martinez-Romero, 1994; Young et al., 1996), показавшие их близкое филогенетическое родство. Структурное сходство коровых участков ЛПС для разных бактерий может быть выявлено также путем гель-электрофореза в полиакриламидном геле и иммуноблоттинга. Использование последней методики позволило выявить серию моноклональных антител (МАК), специфичных для корового региона ЛПС *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Все коровые МАК способны связываться с ЛПС любого изученного штамма *R. leguminosarum*, а также CE3 *R. etli* (Kannenberg et al., 1996; Lucas et al., 1996). Эти данные подтверждают структурную идентичность коровых районов ЛПС *R. leguminosarum* и *R. etli*. В случае штаммов *S. fredii*, *S. meliloti*, NGR234 *Rhizobium* sp. поликлональная антисыворотка против любого из них активно реагирует с “шероховатой” формой ЛПС (ЛПС-2). С использованием поликлональной антисыворотки, приготовленной против штаммов USDA205 *R. fredii* или Rm41 *S. meliloti*, штаммы этих видов могут быть разделены на 4 группы, основанные на реактивности их “шероховатых” ЛПС (табл. 3). На основании этих результатов можно предсказать, что дальнейшее изучение 16S рРНК *S. meliloti* и *S. fredii* позволит разделить их на 4 филогенетически родственные группы. В настоящее время проводится работа по изучению связи между НРАЕС-профилями и филогенетическим родством других видов: *B. japonicum*, *B. elkanii*, *R. tropici*, *M. loti*, *A. tumefaciens*.

II.D. БИОСИНТЕЗ ЛИПИДА-А У *R. ETLI* И *R. LEGUMINOSARUM*

Биосинтез липида-А в ЛПС очень важен для выживаемости *E. coli* (Raetz et al., 1990, 1993; Sirisena et al., 1992). Эта часть ЛПС у энтеробактерий отвечает за токсичность, определяемую гиперстимуляцией иммунной системы хозяина, например, продуцированием летальных количеств опухолевого некротического фактора или других цитокининов (Rietschel et al., 1990, 1992, 1993, 1994; Takada et al., 1992). Для токсичности важны структурные особенности липида-А, включая при-

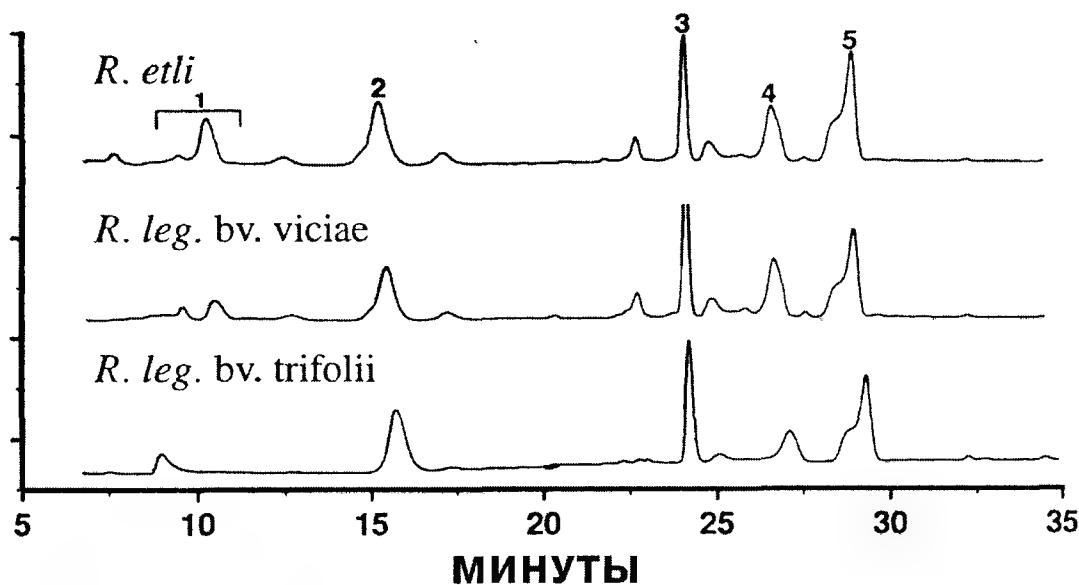
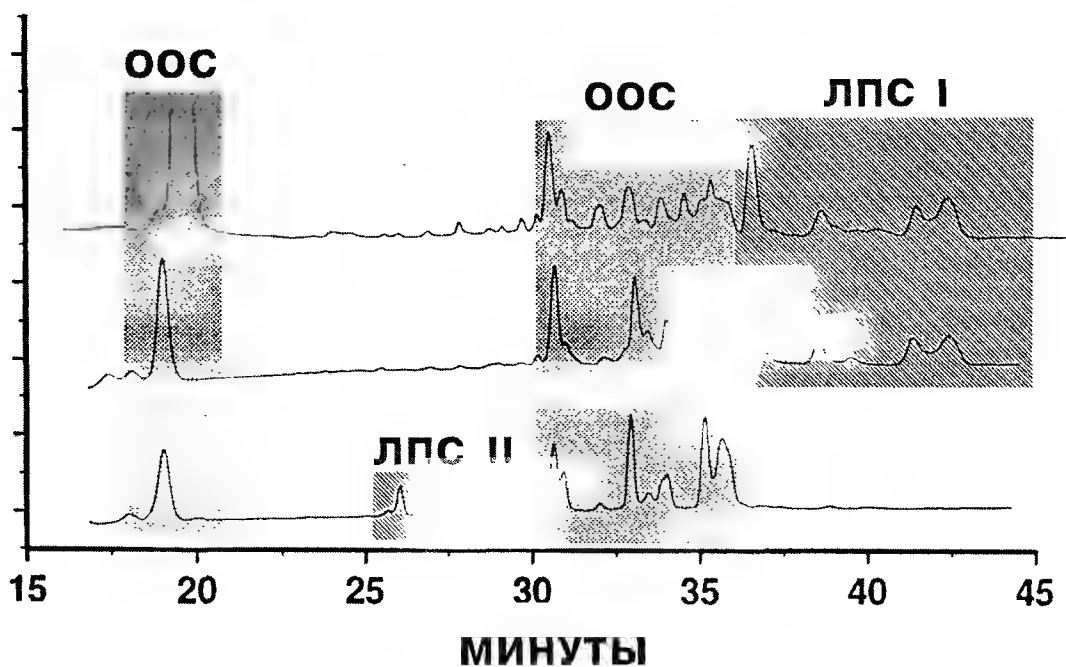
A**B**

Рисунок 4. Анализ коровой части липополисахаридов.

A: *Rhizobium etli*, штамм СТЗ (вверху), *R. leguminosarum* bv. *viciae*, штамм 3841 (в центре) и *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, ANU843 (внизу). Анализ проводили путем анионной обменной хроматографии высокого разрешения (НРАЕС). 1 – мономеры Kdo, 2 – мономеры GalA, 3 – тетрасахарид, 4 – тетрасахарид с остатком Kdo, 5 – трисахарид.

B: *R. fredii* USDA205 (вверху), *Rhizobium* sp. NGR234 (в центре), *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 (внизу). Выделены общие олигосахариды, содержащиеся во всех типах ЛПС (ООС), а также олигосахариды, специфичные для ЛПС-I и ЛПС-2.

Таблица 3. Серогруппы ЛПС-2 у разных видов ризобий, определенные с помощью поликлональной антисыворотки, полученной против штаммов USDA205 *S. fredii* (SF) или Rm41 *S. meliloti* (SM). "+" — положительная реакция, "-" — отрицательная реакция, "+/-" — слабая положительная реакция

Группа	Вид	Штаммы	SF	SM
I	<i>S. fredii</i>	USDA205, USDA208, USDA191	+	-
	<i>Rhizobium</i> sp.	NGR234		
II	<i>S. fredii</i>	USDA257, USDA201, USDA192, USDA196, USDA197, HH103	-	+
	<i>S. meliloti</i>	NRG133, NRG247, NRG286, AK631, Rm1021, NRG185		
III	<i>S. meliloti</i>	NRG23, NRG53	+/-	+/-
IV	<i>S. fredii</i>	HH303	-	-

существование дисахаридного глюкозаминового скелета, фосфатных групп и некоторых остатков жирных кислот. Интерес к изучению липида-A *R. leguminosarum* определяется его уникальной структурой. Биосинтез липида-A у *E. coli*, важного для выживания этих бактерий, изучен подробно (Raetz, 1990, 1993; Clementz et al., 1996, 1997). С использованием различных предшественников липида-A *E. coli* показано, что *R. leguminosarum* имеет те же ферментативные активности, которые у *E. coli* определяют синтез Kdo₂lipid-IV_A (предшественник липида A у *E. coli*) из UDP-GlcNAc (Price et al., 1994) (рис. 5). У *E. coli* реакции биосинтеза Kdo₂lipid-IV_A важны для выживаемости клеток (Raetz et al., 1990, 1993; Sirisena et al., 1992), а присутствие 4-фосфата необходимо для переноса двух остатков Kdo на липид-IV_A от CMP-Kdo, катализируемого Kdo-трансферазой (Brozek et al., 1989; Belunis et al., 1992). После синтеза Kdo₂lipid-IV_A происходит присоединение ацилоксиациловых жирных кислот и формируется зрелый липид-A *E. coli*. Это показывает, что *R. leguminosarum* синтезирует близкий структурный аналог Kdo₂lipid-IV_A, а значит стадии биосинтеза Kdo₂lipid-IV_A важны для выживаемости широкого круга грам-отрицательных бактерий.

Представленные данные показывают, что *R. leguminosarum* обладает уникальными ферментами для превращения предшественника Kdo₂lipid-IV_A в зрелую структуру липида-A (рис. 5). Это позволяет предположить, что *R. leguminosarum* не имеет ацилирующих ферментов для формирования ацилоксиацильных заместителей, а имеет 4'- и 1-фосфатазы, систему окисления, обеспечивающую превращение редуцирующего конца глюкозамина в 2-аминоглюконат, трансферазу, которая переносит галактуронозилный остаток в положение 4', а также уникальную ацил-трансферазную систему для включения 27-ОНС28:0. Недавно у *R. leguminosarum* была выявлена 4'-фосфатазная активность (Price et al., 1995). Соответствующий фермент выявлен у штамма CE3 *R. etli* и у нескольких штаммов *R. leguminosarum*, но не у *E. coli*. Эта фосфатаза обладает предпочтением к Kdo в форме Kdo₂lipid-IV_A как к эффективному субстрату, но не липида-IV_A, и связана с мембраной. В другой работе у *R. leguminosarum* описано присутствие 1-фосфатазной активности (Brozek et al., 1996b). Как и предполагалось, клеточные экстракты *R. leguminosarum* не имеют ацилирующей активности для формирования ацилоксиацильных групп. Кроме того, недавно у *R. leguminosarum* выделен уникальный фермент, необходимый для переноса 27-ОНС28:0 на Kdo₂lipid-IV_A (Brozek et al., 1996a). Этот фермент кодируется открытой рамкой считывания (*orf**) — *lps*-геном, который был ранее выявлен и частично охарактеризован (Selbitschka et al., 1991). Хотя некоторые ферменты биосинтеза липида A *R. leguminosarum* были выявлены, другая информация о генах, кодирующих эти ферменты, не опубликована. В настоящее время продолжается работа по изучению биосинтеза липида A *R. leguminosarum*.

II.E. ГЕНЕТИКА СИНТЕЗА ЛПС У *RHIZOBIUM*

Генетика биосинтеза ЛПС изучена у *R. leguminosarum* и *R. etli*. У штамма СЕЗ *R. etli* выявлен ряд *lps*-локусов (a, b, I) (Cava et al., 1989, 1990; Noel, 1992). β -регион расположен на "несимбиотической" плазмиде (Cava et al., 1989, 1990; Brom et al., 1992; Garcia-de los Santos, Brom, 1997), а другие регионы - на хромосоме. α -регион вовлечен в синтез корового олигосахарида и полисахарида О-цепи и состоит из 9 различных групп комплементации (от А до I) общим размером 17 т.п.н. (Tao et al., 1992; Carlson et al., 1995). Мутации в комплементационных группах А-Е влияют на синтез О-цепи, поскольку мутанты обычно содержат полную коровую структуру, но редуцированную О-цепь. Мутации в группах G-I влияют на синтез корового олигосахарида. Регионы b и I необходимы для синтеза корового олигосахарида. Мутации в любом из этих двух регионов приводят к полному отсутствию О-цепи в ЛПС (Cava et al., 1989, 1990; Bhat et al., 1991a; Brom et al., 1992). У энтеробактерий, таких как *E. coli* и *Salmonella*, гены для биосинтеза кора расположены кластером в *rfa*-районе хромосомы, а для синтеза полисахарида О-цепи - в *rfb*-районе хромосомы (Schnaithman et al., 1993). Таким образом, расположение *lps*-генов у штамма СЕЗ *R. etli* иное, нежели у *E. coli* и *Salmonella* (Cava et al., 1990).

Районы хромосомы, ответственные за образование полисахаридов О-цепей, выявлены и у других штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Priefer, 1989; de Maagd et al., 1989b; Kannenberg et al., 1992) и *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Brink et al., 1990). У мутанта штамма ANU843 *R. leguminosarum* bv. *trifolii* выявлена комплементация α -регионом штамма СЕЗ *R. etli*, что приводило к синтезу О-цепи, характерной для второго, но не для первого штамма. Это подтверждает приведенные выше структурные данные о том, что коровые районы ЛПС *R. leguminosarum* и *R. etli*, являющиеся акцепторами О-цепи, имеют сходные структуры.

В дополнение к α -, β -, и I-регионам, у *R. etli* был выявлен дополнительный регион, необходимый для синтеза "гладкого" ЛПС, т.к. мутации в нем приводят к образованию только "шероховатого" ЛПС (Poole et al., 1994; Allaway et al., 1996). Этот *lps*-район состоит из *dct*-генов, участвующих в транспорте дикарбоновых кислот. Один из полученных мутантов лишен терминального остатка Kdo, присоединенного к О-6 корового галактозильного остатка (Allaway et al., 1996).

Таким образом, необходимо дальнейшее изучение генетики синтеза ЛПС у *R. leguminosarum*. Особый интерес представляют гены, которые контролируют превращение предшественника Kdo₂lipid-IV_A в липид А. Возможно, эти гены не нужны для выживания клеток, а значит возможно получение мутантов, в которых ЛПС содержит липид А, который фосфорилирован, но не имеет жирной кислоты 27-ОНС28:0 (например, мутант *orf**) или не содержит галактуринозильного остатка в позиции 4'. Исходя из важности бактериальной мембраны в симбиозе, представляет интерес изучение действия таких мутаций на коровый район, присутствие О-цепи и на инфицирование растений.

II.F. СТРУКТУРНОЕ ВАРИИРОВАНИЕ ЛПС РИЗОБИЙ ПРИ РАЗВИТИИ СИМБИОТИЧЕСКИХ КЛУБЕНЬКОВ

Первые работы по изучению ЛПС ризобий проводились с использованием химических (Carlson et al., 1978; Carlson, 1982, 1984) и биохимических (Dazzo et al., 1979; Kamberger, 1979) методов. Химический подход позволил вскрыть описанную выше структуру ЛПС *Rhizobium*. Его биохимические свойства менее понятны и привлекают наибольшее внимание современных исследователей. Сочетание генетических, иммунохимических, цитологических и иммуноцитологических подходов позволило подойти к пониманию роли ЛПС в симбиозе.

II.F.1. ЛПС *Rhizobium* и его структурные адаптации в клубеньках и у свободноживущих бактерий

Детальное биохимическое изучение экспрессии ЛПС у свободноживущих бактерий и у бактерий в клубеньках позволило выявить изменения ЛПС, происходящие в процессе симбиоза. По-

сколькo растение предоставляет микробу серию очень разных микрониш, логично ожидать наличия у бактерий различных поверхностных адаптаций. Изучение патогенов животных показало, что их ЛПС структурно меняются в зависимости от условий (Proctor et al., 1995). В связи с этим в настоящее время проводится интенсивное изучение структурных модификаций и адаптаций ЛПС ризобий.

Изучение этой проблемы проводилось с помощью наборов моноклональных антител (МАК), специфичных к О-цепям ЛПС (Johabsen et al., 1984; Brewin et al., 1986; Bradley et al., 1988; de Maagd et al., 1989a; Wright, 1990; Sindhu et al., 1990; Tao et al., 1992; Kannenberg et al., 1992, 1994c; Olsen et al., 1994) или на коровую структуру ЛПС (Lucas et al., 1996). Эти МАК используются в качестве молекулярных проб для выявления тонких изменений в структуре ЛПС, происходящих при симбиозе, а также при воздействии на свободноживущие бактерии факторов, моделирующих условия внутри клубенька.

Экспрессия эпитопов ЛПС у ризобий в чистой культуре и в клубеньках. Использование МАК показало изменения эпитопного состава ЛПС в процессе симбиоза. Эти изменения касаются О-цепей. Дифференциальная экспрессия эпитопов наблюдается при изменении условий роста свободноживущих ризобий, а также при их переходе к симбиозу. Показано, что в зависимости от условий у ризобий могут экспрессироваться различные типы ЭПС (Brewin et al., 1986; Bradley et al., 1988; Kannenberg et al., 1989, 1992, 1994c; VandenBosch et al., 1989; Wood et al., 1989; Sindhu et al., 1990; Tao et al., 1992; Olsen et al., 1994). Экспрессия эпитопов ЛПС была изучена достаточно полно у *R. leguminosarum* и *R. etli*. Эпитопы ЛПС либо синтезируются конститутивно, либо их синтез регулируется. Для регулируемых эпитопов экспрессия регулируется в зависимости от внешних условий. Проведенные исследования позволили сгруппировать эпитопы ризобий в несколько классов. Один из классов регулируемых эпитопов предпочтительно экспрессируется при росте ризобий в чистой культуре, тогда как другой класс – преимущественно в клубеньках (VandenBosch et al., 1989; Sindhu et al., 1990; Tao et al., 1992; Kannenberg et al., 1992, 1994c).

Для того чтобы выявить действие различных хозяев на экспрессию ЛПС, были использованы пары изогенных штаммов *R. leguminosarum*, различающихся только по присутствию определенных *Sym*-плазмид, одна из которых обеспечивала симбиоз с горохом, а другая – симбиоз с фасолью (Sindhu et al., 1990). В условиях чистой культуры ЛПС этих штаммов не обнаруживали различий, однако у ризобий, выделенных из клубеньков, ЛПС различались как для разных штаммов, так и для бактерий в чистой культуре и в клубеньках. Анализ симбиотических изменений эпитопов у двух пар серологически независимых штаммов *R. leguminosarum* показал, что они не являются индивидуальными для каждого штамма. Таким образом, ризобии, которые в чистой культуре синтезируют сходные или идентичные ЛПС, в различных хозяевах, например, в фасоли и горохе, проявляют зависимые от растения модификации ЛПС. Возможно также, что эти модификации зависят не столько от вида растений, сколько от типа клубеньков: детерминированных (фасоль) или недетерминированных (горох). В любом случае, структура клубеньков определяется в конечном итоге условиями и внутренними сигналами, детальное изучение которых в настоящее время привлекает большое внимание.

Структурные адаптации ЛПС при развитии клубеньков гороха. В клубеньках гороха, индуцированных штаммом 3841 *R. leguminosarum*, впервые было показано, что эпитоп, индуцируемый в О-цепи (узнаваемый МАС203) экспрессируется в бактериоидах после их перехода в растительную цитоплазму и включения в симбиосомы, но до экспрессии нитрогеназы (VandenBosch et al., 1989; рис. 6С, 6F). С использованием панели антител, специфичных к эпитопам О-цепи ЛПС, была получена достаточно полная картина экспрессии эпитопов в клубеньках гороха (Kannenberg et al., 1994c). Конститутивно экспрессируемые эпитопы, как и ожидалось, выявляются на всех стадиях развития клубеньков (рис. 6В). Регулируемые эпитопы проявляли два разных типа экспрессии по отношению к продольной оси клубенька: а) радиальный характер экспрессии (рис. 6С) или отсутствие экспрессии (рис. 6D); б) меридиональный характер экспрессии (рис. 6Е). Для сравнения на рисунке 6F показана экспрессия нитрогеназы, которая распределяется меридионально. В клубеньках гороха серологически неродственные штаммы *R. leguminosarum* давали качественно сход-

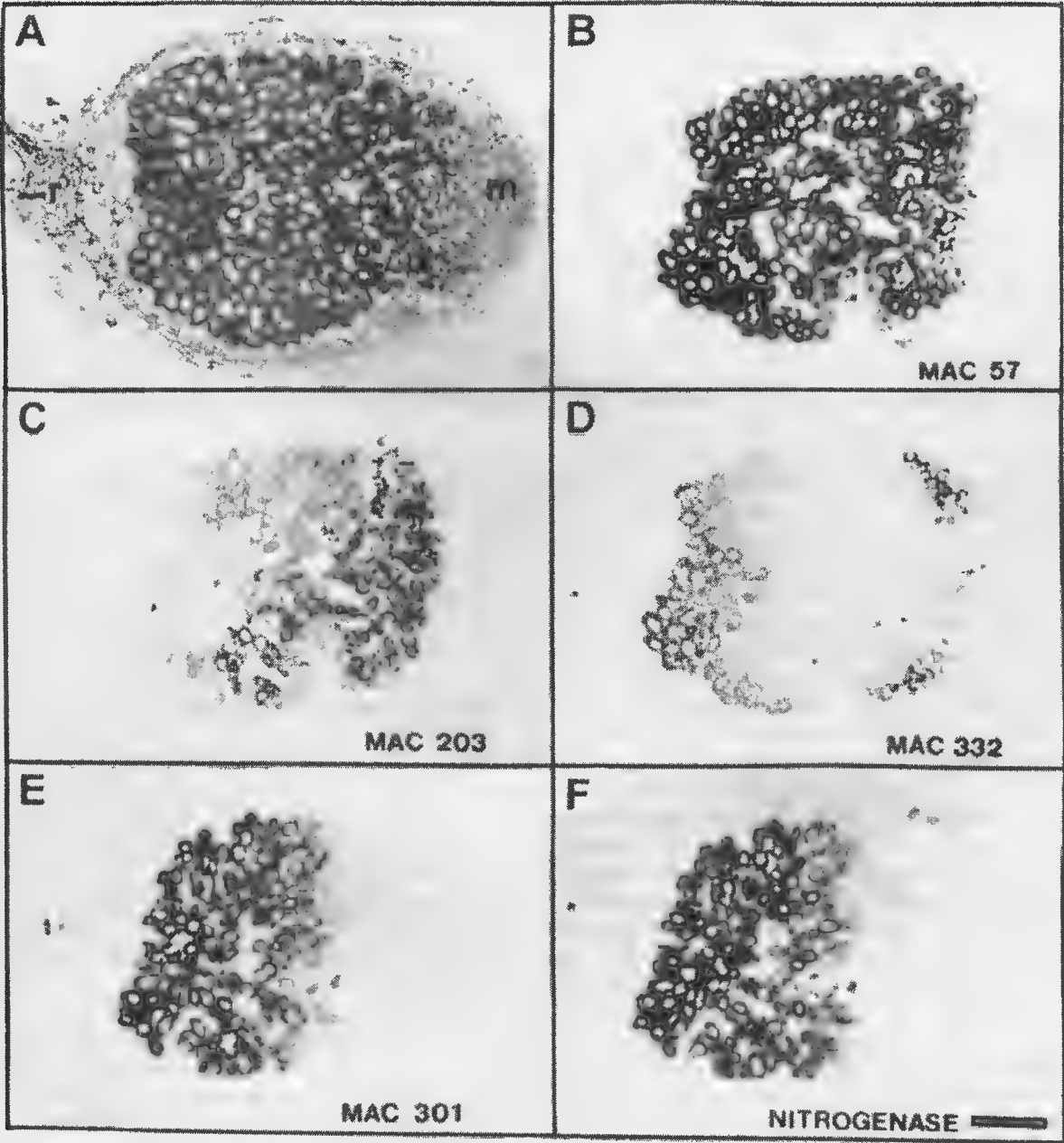


Рисунок 6. Продольные срезы трехнедельных клубеньков гороха. А – срез клубенька, образованного штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* 3841 дикого типа, окрашенный толуидиновым синим (m – апикальная меристема, r – корень). В-Е – срезы, обработанные антителами, указанными на рисунке (Е – антисыворотка против нитрогеназы).

ную картину экспрессии эпитопов (Kannenberg et al., 1994c), которая говорила о том, что состав ЛПС не варьирует случайно в зависимости от индивидуального штамма.

Наблюдаемые изменения в экспрессии эпитопов ЛПС показывают, что наиболее значимые из них происходят после перехода бактерий в симбиоз и при размножении бактерий (VandenBosch et al., 1989). Эти данные показывают, что ЛПС, синтезируемые у бактерий в инфекционных нитях, сходны с ЛПС свободноживущих бактерий. Варьирование экспрессии эпитопов наблюдалось также при переходе в состояние зрелых бактериоидов и на более поздних стадиях развития клубеньков (Kannenberg et al., 1994c).

Резкие изменения экспрессии эпитопов ЛПС *in planta* (VandenBosch et al., 1989; Goosen-de Roo et al., 1991; Kannenberg et al., 1994c) дают основание сомневаться в том, что при этом происходит синтез новых молекул ЛПС. При изучении ЛПС *R. leguminosarum* в клубеньках *Vicia sativa* было показано, что состав эпитопов меняется скачкообразно при эндоцитозе бактериальных клеток (Goosen-de Roo et al., 1991). Авторы предполагают, что это связано с быстрой деградацией или модификацией эпитопов ЛПС-1, а не с синтезом новых молекул.

Механизм регуляции эпитопного состава остается неясным. Отмечено, что радиально экспрессируемые эпитопы отражают локальные различия физиологических условиях в клубеньках, которым подвергаются эндосимбиотические бактерии (Kannenberg et al., 1994c). В частности, различия в количестве кислорода, поставляемого к бактериоидам, может играть важную роль, так как изменения эпитопного состава коррелируют с концентрацией кислорода (Witty et al., 1986). По меньшей мере, один из эпитопов, экспрессируемых вдоль продольной оси развития, связан с созреванием бактериоидов и экспрессией нитрогеназы (известно, что ризобии, не способные экспрессировать этот эпитоп, не могут осуществлять нормальный инфекционный процесс). Поскольку варьирование эпитопов ЛПС не ограничено определенным этапом симбиоза, а происходит на всех стадиях развития клубеньков гороха, очевидно, что многие факторы связаны с регуляцией и продукцией различных структурных модификаций. Структуры различных эпитопов ЛПС, экспрессируемых в клубеньках, до сих пор неясны.

Экспрессия эпитопов ЛПС in vitro. Имеется много данных о механизмах экспрессии эпитопов и структурной адаптации ЛПС. Ризобии можно культивировать при различных условиях и изучать их действие на состав эпитопов. У штамма 3841 *R. leguminosarum* экспрессию эпитопов ЛПС изучали при росте в кислой среде и при разных концентрациях кислорода. В обоих случаях наблюдали экспрессию одних эпитопов и исчезновение других (Kannenberg et al., 1989, 1992, 1994c; Sindhu et al., 1990), что говорит об участии физиологических факторов в экспрессии эпитопов. В другой работе было показано, что бактериоиды штамма CE3 *R. elli* слабо реагируют с моноклональными антителами, которые обычно хорошо реагируют с бактериями, выращенными в лабораторных условиях. Сходная реактивность выявлена для ЛПС бактерий, выращенных при некоторых особых режимах: кислая среда, высокая температура, низкая концентрация фосфата и кислорода (Тао et al., 1992). У штамма 3841 *R. leguminosarum* при культивировании на сложной среде с пониженным содержанием кислорода и близкой к нейтральной реакции экспрессия эпитопов у свободноживущих бактерий была близка к их экспрессии у бактериоидов (Kannenberg et al., 1992).

Не все эпитопы ЛПС, которые коррелируют с различными стадиями развития, могут при определенных условиях экспрессироваться в лабораторной культуре (Kannenberg et al., 1994c). По-видимому, растительные сигналы могут участвовать в экспрессии этих эпитопов. Недавно это было показано для штаммов *S. fredii*, эпитопный состав которых меняется при добавлении в среду растительных экссудатов (Reuhs et al., 1994a). У *R. elli* был выявлен эпитоп ЛПС, который супрессируется при добавлении экссудата семян (Noel et al., 1996b). Активное соединение было охарактеризовано как антоцианин (Noel et al., 1996a; Duelli, Noel, 1997). Таким образом, экспрессия ЛПС и молекулярная адаптация могут определяться как физиологическими условиями, так и растительными сигналами.

Было изучено и действие на модификацию ЛПС почвенных условий. Солеустойчивый штамм *S. meliloti*, выделенный из клубеньков растения *Melilotus*, растущего в засоленной почве Испании (Claret et al., 1995) имел измененную молекулярную массу и антигенные свойства ЛПС, связанные с ионным стрессом и осмотическим давлением. По-видимому, ризобии проявляют суще-

ственную гетерогенность ЛПС в различных микроусловиях, связанных не только с растением, но и с адаптациями к локальным условиям почвы.

Химическое изучение структурной адаптации ЛПС. Структурная основа адаптации ЛПС в ответ на действие различных физиологических факторов до сих пор адекватно не изучена. Показано, что О-цепь ЛПС штамма СЕЗ *R. elli* (производный штамма CFN42), выращенного при pH=4.8, имеет измененный характер метилирования. Это изменение коррелирует со слабым связыванием двух моноклональных антител с ЛПС бактерий, выращенных в кислой среде, по сравнению с бактериями, выращенными в нейтральной среде. Сходное изменение метилирования наблюдается и у бактерий, выделенных из клубеньков (Bhat et al., 1992). Также был изучен ЛПС у штамма 3841 *R. leguminosarum*, выращенного в чистой культуре и выделенного из клубеньков. С использованием метода водно-фенольной экстракции показано, что ЛПС свободноживущих бактерий переходит в основном в водную фазу, а ЛПС из клубеньковых изолятов в равной степени распределяется между обеими фазами. Таким образом, ЛПС, экспрессирующийся у бактерий в клубеньках, более гидрофобен, чем ЛПС бактерий в чистой культуре. Частичная химическая характеристика ЛПС показала, что различия в гидрофобности могут быть связаны с углеводной частью молекулы а также с различным содержанием жирных кислот с длинной цепью (Kannenberg et al., 1994b).

II.F.2. ЛПС-мутанты ризобий и развитие клубеньков

Изучение симбиотических фенотипов у мутантов позволило подойти к пониманию функций, выполняемых ЛПС при развитии клубеньков. Большинство ЛПС-мутантов *Rhizobium* сохраняет способность к образованию клубеньков (Noel, 1992), однако структура этих клубеньков часто нарушена (Noel et al., 1986; Priefer, 1989; de Maagd et al., 1989b; Chapman et al., 1990; Stacey et al., 1991; Kannenberg et al., 1992; Niehaus et al., 1994; Lopez-Lara et al., 1995). Эти нарушения обычно выражаются в отсутствии или резком снижении азотфиксирующей активности. Мутанты, характеризующиеся неполным развитием клубеньков, часто обозначают Ndv⁻ (от англ.: nodule development).

Наиболее сильные фенотипические нарушения характерны для ЛПС-мутантов при образовании детерминированных клубеньков. Например, мутант штамма 62A101c *B. elkanii*, лишенный О-цепи ЛПС, проявляет, в зависимости от сорта сои, несколько разных фенотипов (Stacey et al., 1991). На одних сортах этот мутант вообще не образует клубеньков. На других сортах он образует пустые вздутия или каллусоподобные структуры, в которых отсутствует инвазия бактерий и инфекционные нити, а также имеется центральный проводящий пучок (а не периферийный как в нормальных клубеньках) и наблюдается локализованная гибель эпидермальных клеток. Описан не образующий клубеньков мутант штамма USDA110 *B. japonicum*, лишенный О-цепи ЛПС, но имеющий дополнительную модификацию клеточной поверхности (van de Wiel et al., 1990). Невирулентный мутант *B. elkanii* (штамм 61A76) лишен некоторых сахаров в О-цепи (Maier et al., 1978).

Мутанты *R. etli*, лишенные полисахарида О-цепи ЛПС, симбиотически дефектны: они образуют мелкие белые клубеньки на фасоли (которая, как и соя, образует детерминированные клубеньки), лишенные леглобина (Noel et al., 1986). В них образуется меристема и в течение первых дней развитие происходит нормально, однако затем начинается формирование центрального проводящего пучка. Инфекция является абортивной, и инфекционные нити, блокируемые в корневых волосках, резко отличаются по структуре от нормальных инфекционных нитей. По составу белков эти аномальные клубеньки гораздо ближе к неинкулированным корням, чем к нормальным клубенькам. Молекулярная основа этих нарушений развития клубеньков неясна. И наконец, не было получено ЛПС-мутантов ризобий, которые обеспечивают нормальную инфекцию детерминированных клубеньков, что затрудняет оценку роли ЛПС на более поздних стадиях их развития.

ЛПС-мутанты штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae*, образующих недетерминированные клубеньки на растениях гороха и вики, характеризуются отсутствием О-цепи в ЛПС, аномальной структурой инфекционных нитей и спорадическим эндоцитозом бактерий в растительные клетки (de Maagd et al., 1989b; Priefer, 1989; Perotto et al., 1994). Бактериоиды быстро стареют и фиксируют мало азота. Мутант штамма ANU843 *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, лишенный О-цепи ЛПС, образует на клевере недетерминированные клубеньки со сходными нарушениями (Chapman et al., 1990). Детальный цитологический анализ клубеньков гороха показал, что стенки инфекционных нитей

вторично модифицированы и, возможно, имеют отложения каллозы. Последняя накапливается в межклеточном матриксе, состоящем в основном из растительных гликопротеинов. Эти модификации могут быть связаны с индукцией умеренных защитных реакций у растений (Perotto et al., 1994). ЛПС-мутанты ризобий гороха при эндоцитозе в растительные клетки образуют аномально скрученные и удлинённые бактериоиды (рис. 7). Деление бактерий нарушено, и его синхронизация с делением перибактероидной мембраны (ПБМ) отсутствует — нарушение, характерное для развития недетерминированных клубеньков (Perotto et al., 1994).

Данные о симбиотических свойствах ЛПС-мутантов *S. meliloti* противоречивы. Одни авторы показали, что ЛПС-мутанты штамма SU47 *S. meliloti* в большинстве своем образуют на люцерне нормальные клубеньки (Clover et al., 1989). Однако, эти мутанты не были охарактеризованы химически. PAGE-анализ экстрактов ЛПС показал его изменённую подвижность. Все мутанты содержат ЛПС-1 и ЛПС-2. У штамма Rm2011 *S. meliloti* был получен мутант, с изменённой О-цепью ЛПС (Lagares et al., 1992). Он обладает сниженной интенсивностью образования клубеньков на главном корне многолетней люцерны (*Medicago sativa*) и нарушенной нодуляционной конкурентоспособностью. На однолетней люцерне (*M. truncatula*) этот мутант формировал аномальные клубеньки (Niehaus et al., 1994), в которых бактерии выходили из инфекционных нитей, однако они не могли размножаться в цитоплазме, где формировались многочисленные везикулы. На свежих срезах наблюдали коричневые некротические зоны в центральной части клубенька. Таким образом, этот фенотип сходен с тем, что выявлено для ЛПС-мутантов *R. leguminosarum*. Мутанты *S. meliloti* и *S. fredii*, полностью лишённые О-цепи, еще не описаны. В то же время, имеется ряд указаний на то, что по составу поверхностных молекул *Sinorhizobium* отличается от других ризобий, что также осложняет анализ структурно-функциональных особенностей этих компонентов (разд. II.B.2.).

Имеются данные о симбиотических функциях еще трех классов ЛПС-мутантов ризобий. Один из классов имеет сильно редуцированную О-цепь, но не лишен ее полностью. При инокуляции гороха и фасоли эти мутанты проявляют такой же фенотип, что и мутанты, полностью лишённые О-цепи (de Maagd et al., 1989b; Cava et al., 1989; Kannenberg et al., 1992; Perotto et al., 1994). Таким образом, наличие одного или немногих повторяющихся единиц в О-цепи не может восстановить симбиотические свойства. Второй класс мутантов образует сниженное в три раза количество ЛПС-1 (Cava et al., 1989). Эти мутанты имеют те же фенотипические дефекты, что и мутанты, полностью лишённые ЛПС-1. Эти данные говорят против того, что ЛПС выполняют сигнальные функции, так как в этом случае для сохранения функций достаточно небольшого количества ЛПС. Однако, такое заключение может оказаться преждевременным по двум причинам. Структура ЛПС, экспрессируемого в лабораторных условиях, может быть иная, чем ЛПС, экспрессируемого в клубеньках. Кроме того, изученный мутант лишен хиновозамина — сахара, в норме присутствующего в О-цепи (Тао et al., 1992). Поэтому мутация может иметь плеiotропный эффект, изменяя как структуру, так и количество ЛПС-1. Третий класс мутантов синтезирует О-цепи с резко изменённой структурой (Brink et al., 1990; Kannenberg et al., 1992). Они так же эффективны в симбиозе, как и исходный штамм, что говорит против участия структуры О-цепи в развитии клубеньков. Однако возможно, что О-цепь служит основой для более специфических модификаций структуры, например, присоединения ацетильных или метильных групп, а также разветвлённых сахаров, что может быть важным для развития инфекции. Эта линия рассуждений позволяет предположить существование класса ферментов, которые модифицируют определенные сахара в О-цепи вне зависимости от ее специфической структуры.

Довольно трудно сделать однозначные выводы о структурно-функциональных связях между ЛПС и симбиотическими свойствами ризобий. Во-первых, мутации, приводящие к значительным нарушениям структуры ЛПС, могут оказывать плеiotропное действие на архитектуру всей клеточной поверхности. Полное отсутствие полисахарида О-цепи влияет и на другие мембранные компоненты — коровую часть ЛПС, белки, различные углеводы (например, К-антигены). Взаимодействие этих компонентов с поверхностью растительной клетки может быть причиной нарушения симбиотических свойств у мутантов. Эти мутанты могут иметь ослабленную мембрану с изменённой пропускающей способностью, что приводит к неблагоприятным для симбиоза изменениям

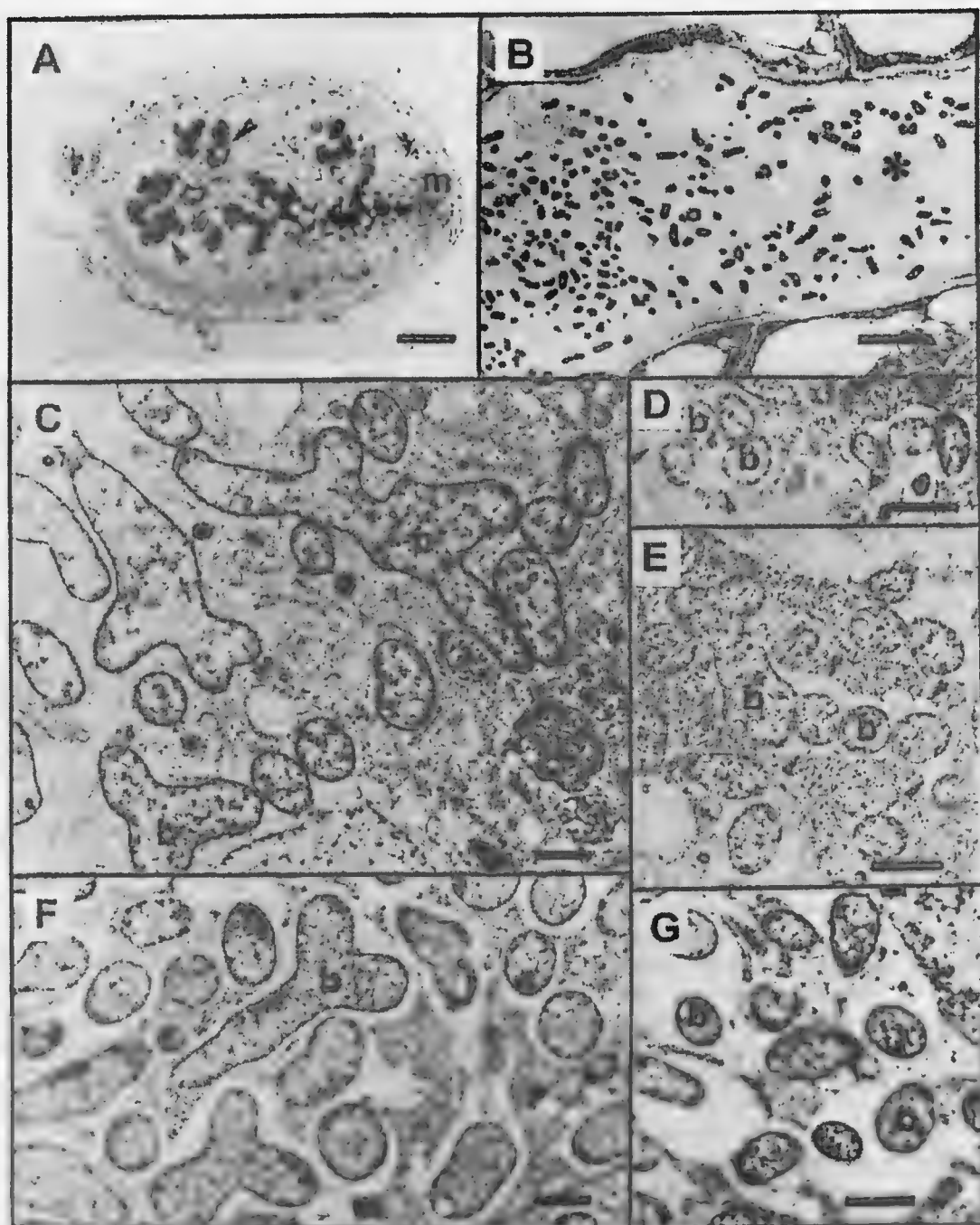


Рисунок 7. Ультраструктура 4-недельного клубенька гороха, образованного мутантом штамма 3841 *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, дефектным по синтезу липополисахаридов. А — срез клубенька, окрашенный толуидиновым синим (редкие бактероиды отмечены звездочками). В — инвазионные структуры, С — бактероиды мутанта, F — бактероиды дикого типа, D, E, G — множественно инфицированные симбиосомы (Perotto et al., 1994).

в обмене молекулами. Кроме того, резкие изменения ЛПС могут компенсироваться модификацией или синтезом других поверхностных компонентов. Действительно, у одного из ЛПС-мутантов *R. leguminosarum* выявлено резкое увеличение количества β -2-связанного глюкана и 10-кратное снижение количества нейтрального капсульного полисахарида (Breedveld et al., 1993). Несмотря на эти сложности, полученные результаты позволили создать представление о важности структуры ЛПС для проявления симбиотических свойств. Для их полного проявления необходима нормальная структура ЛПС, включающая необходимый размер О-цепи, коровый олигосахарид, липид А, а возможно и определенное количество ЛПС (Noel, 1992; Kannenberg et al., 1992).

II.F.3. Возможная роль ЛПС в развитии клубеньков

В процессе становления симбиоза ризобии должны модулировать развитие растений, избегать действия защитных реакций, а также сохранять свою жизнеспособность. Функции ЛПС в осуществлении этих сторон симбиотического взаимодействия окончательно не ясны. В этом разделе мы рассмотрим возможную роль ЛПС на следующих стадиях развития клубеньков: инициация инфекции, инвазия тканей клубенька, эндоцитоз бактерий, развитие и старение бактериоидов.

Инициация инфекции. Инициация развития инфекционных нитей требует не только образования ЛСО, но и присутствия жизнеспособных клеток ризобий в сайте инфекции (Kijne, 1990; Brewin, 1991; van Spronsen et al., 1994). Последнее еще не получило полного объяснения, однако тесный контакт растительных и бактериальных поверхностных компонентов может быть необходимым для формирования инфекционной нити, а также для прикрепления ризобий к корневым волоскам, важного для инициации этого процесса (Kijne et al., 1992).

Тот факт, что большинство ЛПС-мутантов ризобий способно инфицировать растительные ткани, не подтверждает того, что ЛПС абсолютно необходим для инициации инфекции. Однако было показано, что ЛПС штамма 0403 *R. leguminosarum* bv. *trifolii* быстро связывается с кончиками корневых волосков клевера и индуцирует формирование инфекционной нити (Dazzo et al., 1991). Этот эффект не был получен при использовании ЛПС из гетерологичных бактерий. Хотя данные работы и говорят о специфическом взаимодействии партнеров с участием ЛПС, его механизм неясен. Имеются и другие косвенные доказательства участия ЛПС в прикреплении. Во-первых, ЛПС-мутанты *Bradyrhizobium* не способны к образованию клубеньков, что говорит о возможной роли ЛПС в формировании инфекционных нитей при развитии детерминированных клубеньков у сои. Во-вторых, ЛПС-мутант *S. meliloti* имеет сниженную инфекционность при образовании недетерминированных клубеньков у люцерны, что может обуславливать потерю конкурентоспособности (Lagares et al., 1992).

Инвазия тканей корня. В целом, инвазия тканей корня ЛПС-мутантами в большей степени нарушена при образовании детерминированных, чем недетерминированных клубеньков. Для первого типа клубеньков часто наблюдают некрозы и отмирание клеток, что говорит об активации защитных реакций хозяина (Noel et al., 1986; Stacey et al., 1991). Причины этого различия между двумя типами клубеньков неясны (раздел II.F.2.), но они могут отражать различия в микроокружении бактериальных клеток, изменения барьерных свойств клеточных стенок, а возможно и тонкие воздействия ЛПС на растение.

Возможно, различия в фенотипах ЛПС-мутантов отражают разные пути инфекции (Brewin, 1991). В случае недетерминированных клубеньков ЛПС-зависимые модификации влияют главным образом на эндоцитоз бактерий и развитие бактериоидов, что выражается в остановке развития симбиоза на относительно поздних стадиях. Возможно также, что в детерминированных клубеньках тесный контакт бактериальных и растительных клеточных поверхностей может играть решающую роль, либо свободное пространство внутри инфекционной нити столь мало, что в нем создаются высокие концентрации антимикробных факторов, например, фитоалексинов. Фенотипы ЛПС-мутантов ризобий могут быть объяснены действием на них токсичных веществ, вызывающих абортацию инфекционных нитей. Показано, что некоторые мутанты штамма CE3 *R. etli*, лишенные О-цепи ЛПС, более чувствительны к действию корневых экстрактов (Eisen et al., 1994). Однако, значимость этого факта неясна, так как другой ЛПС-мутант (также дефектный по развитию клубеньков) не имел повышенной чувствительности к корневым экстрактам. Фенотипы ЛПС-мутан-

тов на хозяевах, образующих детерминированные клубеньки, сходны с теми, что описаны для ЭПС-дефектных мутантов на растениях, формирующих недетерминированные клубеньки (например, полное отсутствие клубеньков или образование клубеньков, лишенных бактерий) (Noel, 1992). Было показано, что добавление небольших количеств ЭПС может восстанавливать инфекционность ЭПС-мутантов (Djordjevic et al., 1987; Battisiti et al., 1992; Gonzalez et al., 1996). Это показывает, что ЭПС ризобий могут выполнять сигнальные функции. В то же время, ЭПС-мутанты могут нормально нодулировать растения, образующие детерминированные клубеньки, т.е. в этих клубеньках функции ЭПС несущественны или могут быть выполнены другими поверхностными компонентами. Основываясь на симбиотических фенотипах, можно предположить, что ЛПС могут выполнять функции ЭПС при формировании детерминированных клубеньков. Для того, чтобы доказать это, необходимо выполнить два контрольных эксперимента. Во-первых, необходимо показать, что добавление ЛПС или его О-цепи компенсирует симбиотический дефект ЛПС-мутантов. Во-вторых, следует выяснить, может ли при образовании детерминированных клубеньков ЭПС быть функционально заменен другим поверхностным полисахаридом, К-антигеном (см. раздел III), как это наблюдают в случае нодуляции люцерны некоторыми ЭПС-дефектными мутантами *S. meliloti* (Petrovics et al., 1993; Reuhs et al., 1995).

При развитии инфекционных нитей в недетерминированных клубеньках ризобии окружаются растительной клеточной стенкой, которая формирует плотный слой между бактериальной поверхностью и цитоплазматической мембраной растительной клетки. Ионы, такие как бор или кальций, участвуют в развитии клубеньков (Munns, 1970; Sethi et al., 1981; Bolanos et al., 1994) и входят в состав растительной клеточной стенки. Показано, что пектиновые полисахариды растительных клеточных стенок могут ковалентно связываться с бором (O'Neill et al., 1996). Важность кальция для поддержания уронидов и других отрицательно заряженных молекул обсуждается в главе 22 и ряде работ (Brewin, 1991). Показано нарушение развития инфекционных нитей при недостатке бора: увеличивается их размер и меняется форма, что обуславливает их разрыв и выход бактерий в поврежденную растительную клетку, а также сверх-продукцию материала матрикса, в котором находятся клетки ризобий, и нарушенный эндоцитоз (Bolanos et al., 1996). Это до определенной степени напоминает слабые защитные реакции, вызываемые ЛПС-мутантами в клубеньках гороха (Perotto et al., 1994). Бор формирует эфирные связи с гидроксильными группами, которые особенно стабильны в некоторых диолах и полиолах (Loomis et al., 1992). Поэтому гидроксильные группы в коровом районе ЛПС у мутантов, а также в некоторых других компонентах, становятся доступными в результате определенных мутаций и могут приводить к освобождению бора из растительных клеточных стенок, что нарушает их стабильность. Возможно, что это может объяснить то, что различные классы ЛПС-мутантов ризобий (дефектные по О-цепи, имеющие редуцированный ЛПС или уменьшенное количество ЛПС-1) приводят к очень сходным изменениям у растений-хозяев. Другая возможность (которая не исключает первой) состоит в том, что освобождаемые поверхностные компоненты ЛПС-мутанта ризобий влияют на взаимодействие клеточной стенки и цитоплазматической мембраны растительной клетки, что приводит к нарушению развития инфекционной нити (Mohnen et al., 1993; Penel et al., 1996).

Эндоцитоз бактерий. Эндоцитоз происходит при проникновении концов инфекционных нитей во вновь формируемые меристематические клетки. В этом месте конец инфекционной нити не имеет клеточной стенки, и ризобии окружаются "голой" растительной мембраной, образуя симбиосомы (Roth et al., 1989; Brewin, 1991). Однако остается непонятным, представляет ли этот процесс эндоцитоз или фагоцитоз, а также опосредован он рецепторами или интегринами (Verma et al., 1996). В любом случае тесный контакт растительной цитоплазматической мембраны с бактериальной клеточной поверхностью является важным, хотя участвующие в этом контакте бактериальные компоненты до сих пор не выявлены. Во время эндоцитоза происходят существенные изменения бактериальной поверхности. В инфекционных нитях ризобии инкапсулированы поверхностными полисахаридами (ЭПС, КПС), однако теряют свою капсулу при переходе в растительную клетку (Latchford et al., 1991; Roth et al., 1991; Brewin, 1991). Остается неясным механизм, вызывающий эти изменения (Kannenberg et al., 1994a).

Резко уменьшенное количество клеток, инфицированных ЛПС-мутантами ризобий гороха и вики, показывает, что ЛПС играет важную роль в эндоцитозе (Priefer, 1989; de Maagd et al., 1989b;

Perotto et al., 1994). Обсуждаются модели, согласно которым ЛПС играет роль в прикреплении ризобий к цитоплазматической мембране, как это наблюдается у некоторых патогенов животных (Jacques, 1996).

Развитие бактериоидов. Внутри симбиосомы бактерии сначала размножаются, а затем превращаются в плеiomорфные зрелые азотфиксирующие бактериоиды. В молодых симбиосомах растущая растительная мембрана делится синхронно с бактериями и дифференцируется в функциональную ПБМ. В симбиосомах гороха эти процессы происходят одновременно, вследствие чего каждый бактериоид окружен индивидуальной ПБМ. В симбиосомах фасоли эта синхронность нарушена, и в каждой симбиосоме находится несколько бактериоидов (Brewin, 1991). В симбиосомах гороха на поверхности ПБМ отсутствует материал клеточной стенки. Тот факт, что синтез бактериальных ЭПС в симбиосоме подавлен (Latchford et al., 1991; Roth et al., 1991), предполагает, что контакт бактериальной клеточной стенки и ПБМ может быть очень тесным. Такой контакт действительно наблюдают в симбиосомах (Robertson et al., 1985; Roth et al., 1991), однако его функции и обеспечивающие его молекулы еще не выявлены.

Судьба бактериоидов, образованных ЛПС-мутантами ризобий, наиболее детально изучена для гороха (раздел II.F.2.). Выявленные нарушения могут быть связаны с тем, что интактный ЛПС-1 необходим для нормального развития бактериоидов (Kannenberg et al., 1992; Perotto et al., 1994). Привлекает внимание потеря синхронности деления бактерий и ПБМ на стадии внутриклеточного размножения (раздел II.F.2. и рис. 7). Возможно, что адгезия бактериальной мембраны и ПБМ важна для поддержания синхронности и что этот процесс нарушен в случае бактериоидов, образованных ЛПС-мутантами. Некоторые данные о такой адгезии были получены при изучении изолированных мембран из гомогенатов клубеньков (Bradley et al., 1996), но ее молекулярная основа неясна (Brewin, 1991). Поэтому неясно и то, прямо или косвенно участвуют ЛПС в процессе адгезии.

Некоторое понимание того, в чем заключается участие ЛПС в процессе адгезии, может быть получено при биохимическом изучении структурных адаптаций при развитии бактериоидов. В клубеньках гороха бактериоиды имеют уменьшенное количество ЛПС (van Brussel et al., 1977), в котором практически отсутствует ЛПС-2 (Sindhu et al., 1990), а ЛПС-1 имеет измененные размеры и антигенные свойства (Brewin et al., 1986; Sindhu et al., 1990; Kannenberg et al., 1992). Прямое химическое и иммунохимическое изучение показало, что бактериоидные формы ЛПС-1 более гидрофобны (Kannenberg et al., 1994b, 1996). Возможно, что молекулярная масса и гидрофобность являются важными факторами в процессах адгезии, облегчая взаимодействие бактериальной мембраны с ПБМ. Действительно, модификация эпитопов ЛПС происходит при размножении ризобий и их переходе в симбиосомы, что может быть связано с синтезом *de novo* более гидрофобных форм ЛПС (VandenBosch et al., 1989; Goosen-de Roo et al., 1991; Kannenberg et al., 1994c). При этом судьба ранее существовавших форм ЛПС остается неясной. Возможно, что бактериальные поверхностные структуры сбрасываются (Bal et al., 1980), однако эта точка зрения нуждается в дальнейших доказательствах. Постепенное замещение ранее существовавших ЛПС модифицированными формами, возникающими в результате синтеза *de novo*, также вызывает сомнения (Goosen-de Roo et al., 1991), так как смена эпитопов ЛПС происходит быстро. Этот факт наиболее совместим с модификацией ранее существовавших молекул, а не с их заменой на новые (Kannenberg et al., 1994c).

Выяснение функций ЛПС в дифференцировке бактерий затрудняется тем, что некоторые эпитопы экспрессируются на определенных стадиях развития симбиоза. Эти изменения показывают, что в дополнение к общему повышению гидрофобности ЛПС важны и более специфичные структурные изменения. Например, в клубеньках гороха эпитопы ЛПС, узнаваемые моноклональным антителом MAC301, экспрессируются в тесной связи с нитрогеназной активностью (рис. 6). Однако, экспрессия специфичных для этой стадии эпитопов не связана напрямую с активностью нитрогеназы, так как она наблюдается у ризобияльных мутантов по гену *nifH*, лишенных азотфиксации (Kannenberg et al., 1994c). Кроме того, экспрессия, специфичная для данной стадии, не может быть объяснена как результат изменения кислородного статуса клубенька, так что в данной модификации ЛПС могут участвовать дополнительные факторы, возможно связанные с растением (например, антоцианины).

Одной из общих функций ЛПС у грам-отрицательных бактерий является поддержание стабильности наружной мембраны (Vaaga, 1992). Преждевременное старение бактериоидов ЛПС-мутантов в клубеньках гороха может быть объяснено нарушением стабильности мембраны (Perotto et al., 1994) или повышением чувствительности к стрессовым факторам, действующим внутри симбиосомы. Эта гипотеза согласуется с результатами изучения мутанта гороха, имеющего нарушенное развитие бактериоидов (Borisov et al., 1992). В клубеньках этого мутанта, образуемых ризобиями дикого типа, каждая симбиосома содержит несколько бактериоидов, что характерно для клубеньков нормального гороха, образованных ЛПС-мутантом ризобий (Perotto et al., 1994). Хотя бактериоиды в клубеньках мутанта гороха не могут фиксировать азот, они не подвергаются быстрой дегенерации, и в 4-недельных клубеньках не проявляют симптомов преждевременного старения, характерных для бактериоидов, образованных ЛПС-мутантом и нормальными растениями гороха. Это наблюдение показывает, что нормальные клетки ризобий могут противостоять условиям в симбиосомах мутантного гороха, а преждевременное старение ЛПС-мутантных бактериоидов связано с модификациями их клеточной стенки, обусловленными повышенной чувствительностью к физиологическим условиям и антимикробным факторам, действующим *in planta*.

Различия в модификации структуры ЛПС и изогенных штаммов *R. leguminosarum* (различающихся только по "симбиотическим" плазмидам и проявляющих резкие различия структуры ЛПС, образуемого в клубеньках гороха и фасоли), предположительно, отражают различия физиологических условий в клубеньках разных растений. Возможно также, что растительные факторы участвуют в определении выявленных различий. Известно, что при переходе ризобий в состояние бактериоидов в клубеньках фасоли ЛПС становится более гидрофобным. Различия в экспрессии ЛПС в клубеньках фасоли и гороха дают новый материал для изучения тех различий между детерминированными и недетерминированными клубеньками, которые влияют на клеточную и тканевую инвазию ризобий, развитие бактериоидов и симбиосом (Sutton et al., 1981; Kijne, 1990; Brewin, 1991; Roth et al., 1991). Кроме того, возможно, что многие структурные адаптации ЛПС, особенно физиологически контролируемые, не обязательно ограничены определенными условиями клубенька (т.е. не обязательно являются строго клубенек-специфичными), но также могут быть важны для адаптации к условиям почвы. Представление о более общей роли ЛПС в осуществлении адаптивных свойств ризобий позволит объяснить то, почему физиологические условия вызывают синхронные изменения экспрессии эпитопов ЛПС (Kannenberg et al., 1989, 1994c; Sindhu et al., 1990; Tao et al., 1992).

Старение клубеньков. Механизмы, определяющие старение бактериоидов, изучены мало. Обычно считают, что условия внутри симбиосом являются для бактерий стрессовыми (Roth et al., 1991; Brewin, 1991). Симбиосомы могут представлять собой литические компартменты (Werner, 1992), в которых рН балансируется метаболической и азотфиксирующей активностями бактериоидов (Kannenberg et al., 1989; Brewin, 1991). В соответствии с этой моделью, подкисление среды в симбиосоме, осуществляемое растением, может активировать литические ферменты, что в итоге приводит к старению бактериоидов. Поскольку кислая среда индуцирует изменения эпитопного состава ЛПС, возможно, что некоторые эпитопы, которые были подавлены в более молодых частях клубенька, начинают экспрессироваться в более старых частях (Kannenberg et al., 1994c). Однако неясно, связана ли экспрессия новых эпитопов со старением бактериоидов.

II.G. СТРУКТУРНЫЕ АДАПТАЦИИ ЛПС И ДРУГИЕ МОДЕЛИ МЕЖКЛЕТОЧНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Изучение бактериальных патогенов животных и симбионтов растений позволило выявить общие черты структурной адаптации ЛПС. У патогенов животных ЛПС играют важную роль в инфицировании и в выживании внутри хозяина, то есть функционируют как факторы вирулентности (Raetz et al., 1993; Rietschel et al., 1994; Schletter et al., 1995; Proctor et al., 1995; Jacques, 1996; Goldberg et al., 1996; Moran et al., 1996). Например, у штаммов, только что выделенных из инфицированной ткани животного, выявляются ЛПС с О-цепями, а варианты и мутанты, лишенные О-цепей, являются неинфекционными (Lynn et al., 1992; Schnaitman et al., 1993; Whitfield et al., 1993; Whitfield, 1995; Foster et al.,

1995). Это показывает, что для проявления патогенности необходима полная структура ЛПС (О-цепи, коровая часть, липид-А). Патогены животных подвержены лизису, вызываемому комплементом, а также фагоцитозу. Штаммы *Salmonella enteritidis*, выделенные из селезенки цыплят, имеют ЛПС с высоким соотношением О-цепей к коровой части, что говорит о большом числе повторов О-цепи в молекуле (Rahman et al., 1997). В целом, бактерии с многочисленными О-цепями наиболее устойчивы к лизису комплементом или к фагоцитозу. Возможно, что такие ЛПС защищают мембрану от атаки комплемента, снижая возможность его доступа к мембране (Valvano, 1992). Это показывает, что для клеточных взаимодействий важен определенный размер и концентрация ЛПС.

У *Neisseria* модификация (например, сиалитация) ЛПС может минимизировать защитные реакции, так как позволяет бактериям мимикрировать гликоконъюгаты хозяйских клеток (Van Putten, 1993; Preston et al., 1996), что говорит о важной роли специфичности в клеточных взаимодействиях. Однако, роль бактериальных ЛПС в патогенезе животных еще далека от полной изученности. В частности, мало понятны молекулярные механизмы и функции, определяющие действие ЛПС на бактериальную клетку и на межклеточные взаимодействия. Интересно, что ЛПС могут быть вовлечены в прикрепление к клеточным структурам и к компонентам внеклеточного матрикса (Jacques, 1996). Эти данные открывают новые пути для выяснения механизмов проникновения бактерий в клетку.

Проведенные работы показывают также чрезвычайную лабильность молекулярной структуры ЛПС. Они могут менять молекулярный размер, количество и состав в зависимости от специфических потребностей бактерии (выживание или межклеточные взаимодействия) в различных микроусловиях. Кроме того, активный генетический анализ патогенов животных, например, выявление генов, участвующих в присоединении О-цепей (Whitfield, 1995) позволит выяснить, имеются ли подобные гены у ризобий.

Изучение ЛПС у патогенов растений пока находится на описательной стадии (Denny, 1995). Возможно, что их первичными функциями являются обеспечение барьера для токсических факторов растения, а также выживание бактериальных клеток. Выявление ЛПС-мутантов *Xanthomonas campestris* с измененным коровым районом ЛПС согласуется с этим предположением (Dow et al., 1995). Реакция данных мутантов с различными хозяйскими и нехозяйскими растениями изменена, что выражается в снижении числа бактерий, выявляемых в течение первых 24 часов после инокуляции.

Имеются и данные в пользу более прямого участия ЛПС в инфицировании растений. Так, ЛПС *X. campestris* могут индуцировать экспрессию генов, связанных с защитой, у *Brassica campestris* (Newman et al., 1995), а инокуляция растений табака очищенными ЛПС некоторых бактерий может предотвращать реакцию гипер-чувствительности на несовместимые бактерии, а также подавлять симптомы совместимых взаимодействий (Mazzucchi, 1983). Возможно, что ЛПС участвуют также в индукции системной устойчивости против растительных патогенов (Sequeira, 1983; Leeman et al., 1995). Однако пока молекулярные механизмы этих процессов практически не изучены. Мало известно также об участии структурных модификаций ЛПС в адаптации к стрессам, которым бактерии подвергаются, находясь внутри растений при развитии патогенного процесса.

III. К-антигены

К-антигенами были названы кислые капсулярные антигены *E. coli* (от: Kapselantigene), так как они являются антигенами бактериальной клеточной поверхности, отличающимися от ЛПС (О-антигены) и ЭПС. К-антигены тесно связаны с бактериальной клеткой, не придают колониям слизистую морфологию и являются компонентами многих бактерий (Whitfield et al., 1993), формируя покров из кислого полисахарида на поверхности клетки (Jann et al., 1990, 1991). По-видимому, эти антигены защищают бактерии от иммунных атак хозяина и поэтому важны для проявления вирулентности патогенов. На основе ряда критериев К-антигены *E. coli* разделяют на два подкласса. К-антигены группы I характеризуются экспрессией, нечувствительной к температуре, отсутствием фосфатидиновой кислоты и преобладанием больших повторяющихся полисахаридных единиц, содержащих уроновые кислоты и замещающие группы, например пируват как кислый компонент. В этом смысле К-антигены группы I аналогичны ЭПС ризобий. Предполагается, что у *E.*

coli антигены этой группы прикреплены к наружной мембране через липид-А, однако убедительных доказательств этого пока не получено. К-антигены группы I не изучены столь подробно, как рассмотренные ниже полисахариды группы II.

III.A. ГРУППА II К-АНТИГЕНОВ

К-антигены группы II содержат Kdo, сиаловую кислоту, аминокислоты или фосфаты в качестве кислых компонентов (Jann et al., 1990, 1991). В отличие от антигенов первой группы, они состоят из относительно малых повторяющихся единиц, включающих 1-3 остатка сахара, и имеют гораздо более высокую плотность заряда. Прикрепление к мембране происходит через фосфатидиловую кислоту, так как липидный компонент в антигенах группы II связан с редуцирующим концом посредством Kdo. У *E. coli* экспрессия этих антигенов регулируется температурой: их появление в капсуле наблюдают при температуре 20°C и выше (Orskov et al., 1984).

В ряде работ была изучена генетика экспрессии антигенов группы II у *E. coli* (Boulnois et al., 1987, 1993; Finke et al., 1991; Bronner et al., 1993; Pazzani et al., 1993; Petit et al., 1995). Выявленные гены группируются в трех смежных регионах, обозначенных как *kps*-кластер. Регион 1 (около 7 т.п.н.) кодирует 6 белков: KpsF, KpsE, KpsD, KpsU, KpsC, KpsS (Pazzani et al., 1993). Функции некоторых из них были определены на основании гомологии аминокислотных последовательностей и биохимических дефектов мутантов. Оказалось, что KpsE и KpsD участвуют в экспорте полисахарида через клеточную стенку после его переноса из цитозоля (Silver et al., 1987; Wunder et al., 1994; Rosenow et al., 1995a). На этой стадии происходит присоединение липидного "якоря" к редуцирующему концу: мутации в данных генах приводят к накоплению липид-связанного полисахарида в периплазматическом пространстве (Pazzani et al., 1993; Wunder et al., 1994; Rosenow et al., 1995a). Анализ аминокислотной последовательности белка KpsE показал, что он интегрирован в цитоплазматическую мембрану (Rosenow et al., 1995a). В белке KpsD выявлена сигнальная последовательность, что говорит о локализации в периплазме (Wunder et al., 1994). Белок KpsU является Kdo-синтазой, специфичной для биосинтеза К-антигенов, т.к. его последовательность проявляет сходство с СМР-Kdo-синтазой — ферментом, ответственным за синтез Kdo, входящего в состав ЛПС (Finke et al., 1989, 1990; Rosenow et al., 1995b). Присутствие второго гена для биосинтеза Kdo показывает, что К-антигены и ЛПС не имеют общих путей биосинтеза.

Белки KpsC и KpsS участвуют в транспорте К-антигенов к клеточной поверхности (Bronner et al., 1993). Отсутствие N-концевой сигнальной последовательности и гидрофобного домена, типичного для мембранных белков, говорит об их функционировании в цитозоле. Оба гена влияют на перенос полисахарида через цитоплазматическую мембрану, а также на длину его цепи.

Регион 2 является штаммо-специфичным и содержит гены, кодирующие белки синтеза различных моносахаридов, гликозил-трансфераз и полимераз повторяющихся единиц, необходимых для синтеза цепи, специфичной для К-антигенов (Boulnois et al., 1990; Pazzani et al., 1991). Регион 2 фланкирован регионами 1 и 3, которые являются консервативными у штаммов, имеющих *kps*-кластер генов для синтеза К-антигенов группы II.

Регион 3 (около 1.6 т.п.н.) содержит оперон, состоящий из 2 генов, *kpsM* и *kpsT* (Pavelka Jr. et al., 1991; Pavelka et al., 1994; Saier Jr., 1994). Предсказанные аминокислотные последовательности белков KpsM и KpsT сходны с АТФ-зависимыми транспортными белками — ABC кассетой и поэтому могут участвовать в транспорте зрелого полисахарида через цитоплазматическую мембрану. Мутации в этих генах приводят к локализации низкомолекулярного полисахарида в цитозоле.

III.B. СТРУКТУРЫ К-АНТИГЕНОВ РИЗОБИЙ И ДРУГИХ БАКТЕРИЙ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С РАСТЕНИЯМИ

К-антигены ризобий отличают от других поверхностных полисахаридов на основании нескольких критериев (Reuhs et al., 1993; Petrovics et al., 1993; Kim et al., 1996b). Во-первых, они отличаются от ЭПС тем, что не выделяются в культуральную среду, прочно прикреплены к клеточной поверхности, проявляют антигенные свойства и имеют иную структуру (Reuhs et al., 1994b).

Во-вторых, отсутствуют данные о том, что полисахариды К-антигенов ризобий прикреплены к липидному якорю, такому как фосфатидиловая кислота или липид-А, как это наблюдается для К-антигенов других бактерий и для ЛПС. В-третьих, К-антигены ризобий структурно отличаются от ЛПС тем, что содержат больше Kdo или вариантов Kdo, которые дают положительный ответ в тесте на тиобарбитуровую кислоту (ТБК) и имеют более высокую плотность отрицательного заряда на каждой повторяющейся единице, а иногда и на каждом остатке сахара. В некоторых работах (Carlson et al., 1985; Putnoky et al., 1990; Williams et al., 1990a, 1990b; Brzoska et al., 1991) грубые препараты К-антигенов ошибочно идентифицировали как ЛПС на основе присутствия Kdo (ТБК-положительный материал), считая Kdo маркером ЛПС. Это привело к неправильным выводам о том, какие гены затронуты у определенных мутантов, а также о роли ЛПС в симбиозе.

К-антигены ризобий были впервые выявлены в водном слое при горячей водно-фенольной экстракции в процессе выделения ЛПС *S. fredii* и первоначально идентифицированы как производные ЛПС (Carlson et al., 1985). Затем было показано, что К-антигены — это особые молекулы, которые могут быть отделены от ЛПС путем гель-фильтрационной хроматографии в присутствии DOC (Reuhs et al., 1993). У штаммов *S. fredii* определены структуры 3-х К-антигенов (Reuhs et al., 1993; Forsberg et al., 1997), а также исследуются структуры еще нескольких К-антигенов из *S. fredii*, *S. meliloti*, NGR234 *Rhizobium* sp. (табл. 4). Эти структуры варьируют у разных видов и штаммов. Однако при этом может быть выявлен консервативный структурный мотив дисахаридного повтора, включающего вариабильный гликозильный остаток связанный с 1-карбокси-2-кето-3-деокси сахаром (Kdx). У *S. fredii* этим сахаром является Kdo, тогда как у *S. meliloti* и NGR234 *Rhizobium* sp. он представляет собой разновидность нонулозоновой кислоты, а в одном из случаев это N-ацетилнейраминовая кислота. Исключением является К-антиген штамма HN303 *S. fredii*, у которого не выявлено Kdo. Важно отметить, что этот штамм отличается по хозяйской специфичности от других штаммов *S. fredii*: он может формировать клубеньки на некоторых американских сортах сои.

Изучение полисахаридов К-антигенов было облегчено использованием PAGE (с DOC или без него) и процедуры окрашивания красителем Альциановый голубой и серебром (Corzo et al., 1991; Reuhs et al., 1993). К-антигены и ЛПС можно легко различить, так как первые окрашиваются серебром только в присутствии Альцианового голубого, а вторые не мигрируют в гель в отсутствие DOC (Reuhs et al., 1993; Kim et al., 1996b). К-антиген стабильно формирует специфичный для Альцианового голубого ступенчатый профиль или мазок. Ступенчатый профиль связан с гетерогенностью по степени полимеризации, а мазок, возможно обусловлен дополнительной микрогетерогенностью в различных замещающих группах (когда они имеются).

С использованием этой методики было проведено систематическое изучение присутствия К-антигенов у многих бактерий, ассоциированных с растениями. В работу были взяты, помимо ризобий, многие хорошо изученные растительные патогены: *A. tumefaciens*, *Erwinia amylovora*, *E. carotovora*, *E. stewartii*, *Pseudomonas solanacearum*, *P. syringae*, *Xanthomonas campestris* (Reuhs et al., 1994b, 1997). Оказалось, что связанные с клеткой кислые полисахариды являются общими компонентами экстрактов этих бактерий. Анализ состава полисахаридов *Rhizobium* показал отсутствие консервативного структурного мотива, характерного для *Sinorhizobium* (табл. 3), т.е. они не содержали сахар Kdx. Однако, изучение К-антигена *A. tumefaciens* показало присутствие данного сахара (Reuhs et al., 1997). Таким образом, кислый капсулярный полисахарид является общим компонентом широкого круга растительных симбионтов и патогенов.

III.C. ЭКСПРЕССИЯ К-АНТИГЕНОВ У РИЗОБИЙ

Генетический анализ показал, что образование капсулы у штамма AK631 *S. meliloti* контролируется несколькими генетическими регионами, в которые входит не менее 15 генов, а вероятно и намного больше. Один из плазмидных регионов содержит ген *rkpZ*, экспрессия которого снижает размер экспортируемого К-антигена (Reuhs et al., 1995). Эта низкомолекулярная форма К-антигена, необходима для инфекционности ЭПС-мутантов (см. ниже). Активность RkpZ является неспецифичной по отношению к структуре К-антигена, поскольку перенос гена из AK631 *S. meliloti*

Таблица 4. Структуры К-антигенов ризобий

Штамм	Структура	Ссылка
Sf USDA205	$[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 5)\text{-}\beta\text{-D-Kdop-(2}\rightarrow]_n$ $[\rightarrow 2\text{-O-MeMan}\rightarrow \text{Kdo}\rightarrow]_n$	Reuhs et al., 1993
Sf USDA257	$[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow 5)\text{-}\beta\text{-D-Kdop-(2}\rightarrow]_n$ $\{\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-2-OMeManp-(1}\rightarrow 5)\text{-}\beta\text{-D-Kdop-(2}\rightarrow]_n$	Forsberg et al., 1997
Sf USDA201	$[\rightarrow \text{Gal}\rightarrow \text{Kdo}\rightarrow 2\text{-OMeHex}\rightarrow \text{Kdo}\rightarrow]_n$	Reuhs et al., 1997
Sf USDA208	$[\rightarrow \text{Gal}\rightarrow \text{Kdo}\rightarrow]_n$	Reuhs et al., 1997
Sm NRG185	$[\rightarrow \text{GlcNAc}\rightarrow \text{Kdo}\rightarrow]_n$	Reuhs et al., 1997
Sm NRG247	$[\rightarrow \text{Glc}\rightarrow \text{NeuNAc}\rightarrow]_n$	Reuhs et al., 1997
Sm AK631	$[\rightarrow (\text{R}_1)\text{Hex}\rightarrow (\text{R}_2)\text{Kdn5NAc7NAc}\rightarrow]_n$	Данные авторов
Rsp. NGR234	$[\rightarrow \text{Glc}\rightarrow \text{Kdn5NAc7NAc}\rightarrow]_n$	Reuhs et al., 1997
Sf HH303	$[\text{Rha, GalA}]_n$	Reuhs et al., 1997
Консенсус	$[\rightarrow (\text{R}_1)\text{Sug}\rightarrow (\text{R}_2)\text{Kdx}\rightarrow]_n$	

Gal – галактоза, Kdo – 3-дезоксид-D-манно-2-октуклозоновая кислота, Man – манноза, Hex – гексоза, Me – метильная группа, Kdn5NAc7NAc – 2-кето-3,5,7,9-тетрадезоксид-5,7-диаминононуклозоновая кислота, NeuNAc – N-ацетилнейраминаовая кислота, R₁ или R₂ – ацетильный или бета-гидроксидбутирильный остатки, Sug – любой сахар, Kdx – 1-карбоксид-2-кето-3-дезоксид-сахар. Единственным исключением из консенсусной структуры является штамм HH303, который описан в тексте. Sf – *Sinorhizobium fredii*, Sm – *S. meliloti*, Rsp – *Rhizobium* sp.

в USDA257 *S. fredii* также приводит к снижению размера К-антигена, хотя антигены родительских штаммов структурно различаются (Reuhs et al., 1995).

Вторым локусом, контролирующим образование К-антигенов, является хромосомный локус *fix-23* (Putnoky et al., 1990; Petrovics et al., 1993). Одна из комплементационных групп этого локуса, состоящая из 6 открытых рамок считывания (*rkpABCDEF*) кодирует липидный переносчик, вовлеченный в биосинтез и экспорт компонентов капсулы (Petrovics et al., 1993), так как расположение генов в цистроне и их последовательности сходны с тем, что обнаружено для генов биосинтеза жирных кислот у крыс.

Три другие группы комплементации содержат 4 гена (*rkpGHII*), продукты которых могут модифицировать липидный переносчик или процесс полимеризации. Два мутанта по этим генам сохраняли чувствительность к фагу, который связывается с К-антигеном. С использованием ELISA и иммуноблоттинга было показано, что эти мутанты частично экспортируют К-антиген (Kiss et al., 1997). В то же время, многие мутации в регионе *fix-23* приводят к внутриклеточному накоплению неполностью полимеризованных К-полисахаридов. Тот факт, что кластер *rkpABCDEF* отсутствует у *E. coli*, показывает, что механизм экспрессии К-антигенов у почвенных бактерий может иметь фундаментальные особенности. Несмотря на это, белок RkpZ сходен с KpsC *E. coli*, который также влияет на структуру цепи К-антигена (Pazzani et al., 1993). Кроме того, предполагаемая последовательность белка RkpJ гомологична последовательности белка KpsS *E. coli*, который также вовлечен в полимеризацию и экспорт К-антигенов группы II (Pazzani et al., 1994; Bronner et al., 1994).

На основании данных, полученных при изучении *S. meliloti* и *S. fredii* была предложена модель экспрессии К-антигенов (Reuhs et al., 1995): (1) дисахаридная повторяющаяся единица синтезируется с участием генных продуктов, кодируемых еще не охарактеризованными генами, и первоначальная полимеризация повторяющихся единиц может происходить на липидном переносчике.

что приводит к образованию полисахаридных субъединиц массой 5000–7000 дальтон (8–15 повторяющихся единиц). (2) Экспортируемые полисахариды могут собираться на специфичном для капсулы липидном переносчике, кодируемом регионом *fix-23*, что приводит к образованию высокомолекулярных полимеров из описанных выше субъединиц. (3) Процесс полимеризации модифицируется белком RkpZ, который обеспечивает экспорт небольших полисахаридов. Интересно, что у энтеробактерий размеры К-антигенов и О-цепей ЛПС регулируются особым геном *cld* (Batchelor et al., 1992; Stevenson et al., 1995; Dodgson et al., 1996; Franco et al., 1996). Возможно, что RkpZ является функциональным аналогом продукта гена *cld*. (4) После терминации процесса полимеризации К-антигены экспортируются на клеточную поверхность и при этом липидный переносчик может быть отделен и рециклизован. В случае К-антигенов *E. coli* KpsD является возможным кандидатом на отделение липидного переносчика при транспорте через клеточную поверхность, так как этот белок гомологичен фосфатидилглицерофосфатазе PgpB (Icho, 1988a, 1988b). Возможно, что сходный белок участвует в экспорте К-антигенов и у ризобий.

Генный район, который определяет хозяйскую специфичность взаимодействия *S. fredii* с соей, влияет также и на экспрессию К-антигена (Balatti et al., 1990; Kim et al., 1996a). Мутации в генах *noIWXBTUV* штамма USDA257 *S. fredii* приводят к расширению спектра хозяев на сорта сои, которые не инфицируются исходным штаммом. Такие мутанты имеют измененную химию клеточной поверхности с нарушениями ЛПС и К-антигенов (данные авторов). Механизм действия продуктов *noI*-генов пока неясен. Однако, их продукты могут играть вторичную роль в экспрессии К-антигенов, так как оперон *noIWXZBTUV* специфичен для *S. fredii* и отсутствует у *S. meliloti*. Интересно, что некоторые гены этого оперона гомологичны *hrp*-генам *Xanthomonas* и *Pseudomonas* (Mainhardt et al., 1993; Huguet et al., 1997).

III.D. БИОЛОГИЯ К-АНТИГЕНОВ РИЗОБИЙ

Штамм AK631 *S. meliloti* является *exoB*-мутантом штамма Rm41, который, не образуя ЭПС-1 и ЭПС-2, тем не менее формирует азотфиксирующие клубеньки на *Medicago sativa* (Putnoky et al., 1988, 1990). Очевидно, что функции ЭПС выполняет иной поверхностный компонент. Мутации в гене *rkpZ* или в генах кластера *rkpABCDEFGHII* штамма AK631 приводят к образованию не фиксирующих азот клубеньков (Putnoky et al., 1988; Williams et al., 1990a, 1990b). Для штаммов *S. meliloti*, имеющих ген *rkpZ*, показано, что К-антиген в отсутствие ЭПС может обеспечивать инфицирование люцерны.

Недавние исследования показали индукцию защитных реакций растения очищенным К-антигеном. В этой работе были использованы штаммы *S. meliloti*: Rm41, AK631, три капсульных мутанта штамма AK631 (*rkpA*, *rkpH*, *rkpJ*), а также очищенный К-антиген штамма AK631 (Besquart-de Kozak et al., 1997). Инъекция клеток AK631 или очищенного К-антигена в листья люцерны приводила к существенному накоплению мРНК халькон-синтазы (CHS), которая играет важную роль в фенилпропаноидном биосинтетическом пути. Это свидетельствует об основанном на сигнале ответе растения на бактериальный продукт. В то же время, отсутствовал ответ на целые клетки *rkp*-мутантов, которые не имели капсульного К-антигена и не могли инфицировать растение, а также на ЭПС. Это показывает, что синтез мРНК CHS по крайней мере частично определяется К-антигеном. Важно отметить, что кинетика этого синтеза не такая, как при инъекции патогена, то есть ответ растения на клетки штамма AK631 *S. meliloti* отличается от ответа на клетки патогенов. Кроме того, живые клетки AK631 вызывают двухфазную индукцию мРНК CHS, тогда как убитые клетки или очищенный К-антиген вызывают лишь первую фазу ответа. Это говорит о нормальном образовании продукта, ответственного за вторую фазу ответа. Возможно, что растение в ответ на К-антиген продуцирует сигнальные молекулы, которые вызывают модификацию бактерий, необходимую для синтеза элиситора второй фазы. Было показано, что на экспрессию бактериальных К-антигенов влияют растительные продукты. Добавление апигенина — флавоноида, индуцирующего *nod*-гены, в среду культивирования штамма USDA205 *S. meliloti* повышает соотношение минорных фракций к мажорным (Reuhs et al., 1994a). Кроме того, экстракт корней растения-хозяина резко усиливает экспрессию К-антигенов штамма AK631 *S. meliloti* (Reuhs et al., 1995). Эти эффекты могут играть важную роль в процессе инфицирования.

Экспрессия К-антигенов ризобий находится под влиянием абиотических факторов, включая температуру и кислотность. Было предпринято изучение экспрессии К-антигенов ризобий при температурах ниже 20°C, которые подавляют синтез К-антигенов у *E. coli* (Orskov et al., 1984; Jann et al., 1990). Принимая во внимание сильные различия условий обитания ризобий и *E. coli*, можно было ожидать отсутствия данного эффекта у ризобий. И действительно, К-антигены ризобий экспрессировались при очень низких температурах (7-18°C) и были обнаружены изменения в их размерах (данные авторов). Второе наблюдение может быть существенным, так как размер К-антигенов и ЭПС-2 играет важную роль в инфекционном процессе (Reuhs et al., 1995; Gonzalez et al., 1996).

IV. Заключение

Наружная мембрана и окружающая капсула ризобий частично состоят из сложного набора молекул ЛПС и К-антигенов. Эти классы молекул функционально важны для формирования симбиотических ассоциаций с растениями-хозяевами. Однако к настоящему времени их конкретные функции неясны. Изучение связи между структурой и функциями ЛПС затруднено сложностью этих молекул, а также недавно выявленными у них структурными адаптациями к условиям роста бактерий. Последние работы по расшифровке последовательности "симбиотической" плазмиды штамма NGR234 *Rhizobium* sp. могут оказаться полезными для изучения взаимосвязи между структурой и функциями поверхностных молекул (Freiberg et al., 1997). Выяснилось, что в дополнение к генам, необходимым для образования клубеньков и азотфиксации, эта плазмида несет ряд генов, сходных с генами биосинтеза полисахаридов. Хотя функции их продуктов еще неясны, возможно, что они вовлечены в некоторые структурные адаптации, которые претерпевают поверхностные полисахариды при симбиозе.

Изучение К-антигенов ризобий привлекает все больший интерес. Хотя о К-антигенах известно намного меньше, чем об ЛПС, некоторые выводы уже могут быть сделаны. К-антигены имеются у всех ризобий, а также и у многих других бактерий, взаимодействующих с растениями. Изучение *S. meliloti* и *S. fredii* показало, что капсульные полисахариды - это поверхностные антигены, которые являются структурно варьируемыми и штаммо-специфичными, но при этом имеют консервативные мотивы, характерные для каждого вида. В образовании капсулы участвуют не менее 15 генов, локализованных в различных районах генома. Их экспрессия модулируется веществами, выделяемыми растением, а также некоторыми факторами среды. К-антигены участвуют в индукции защитных ответов некоторых растений-хозяев на инфицирование ризобиями.

Структурный анализ ЛПС показал связь между структурами коровых регионов и липида-А и таксономией различных видов Rhizobiaceae. Оказалось также, что ЛПС ризобий и энтеробактерий различаются по структуре, хотя синтез липида-А, который особенно важен для выживания клеток грам-отрицательных бактерий, имеет у этих микроорганизмов много общего. Только после синтеза минимального предшественника липида-А, важного для выживания клеток, возникают структурные модификации, являющиеся уникальными для липида-А *R. leguminosarum*.

Анализ ЛПС у различных мутантов показал, что: (а) эффективный симбиоз с растениями, образующими детерминированные и недетерминированные клубеньки, требует наличия О-цепи; (b) мутанты с уменьшенным количеством ЛПС, содержащего О-цепь, или с укороченными О-цепями, не являются полноценными симбионтами. Анализ недетерминированных клубеньков, образуемых ЛПС-мутантами *R. leguminosarum* на горохе и вике, показал, что симбиоз нарушается во время и(или) после перехода бактерий в растительные клетки. Однако, при образовании детерминированных клубеньков нарушения возникают на более ранних стадиях роста инфекционной нити. Эти фенотипы могут быть связаны с повышенной чувствительностью ослабленных бактерий к антимикробным соединениям, продуцируемым хозяином. Химический и иммуноцитологический анализ показал, что при формировании недетерминированных клубеньков происходит повышение гидрофобности ЛПС, а также некоторое изменение структуры О-цепей при эндоцитозе бактерий и дифференцировке бактериоидов. Хотя конкретные функции ЛПС еще неясны, возможно, что они важны для специфических взаимодействий между поверхностями бактериальных и растительных клеток (мембранные взаимодействия). При формировании детерминированных клу-

беньков эти взаимодействия могут начинаться уже во время формирования инфекционных нитей. В недетерминированных клубеньках эти взаимодействия начинаются во время перехода бактерий в растительные клетки кортекса и во время синхронных делений бактерий и ПБМ при формировании бактериоидов. Гипотеза о том, что ЛПС участвуют в этих межклеточных (мембранных) взаимодействиях, согласуется со временем проявления нарушений симбиоза ЛПС-мутантов в детерминированных и недетерминированных клубеньках. Однако еще предстоит выяснить конкретные молекулярные механизмы взаимодействия между бактериальным ЛПС и мембранами инфекционных нитей и симбиосом.

Развитие симбиоза сопровождается также структурными изменениями О-цепей ЛПС, которые могут быть выявлены с помощью моноклональных антител. Однако, функции О-цепей в процессе симбиоза неясны. Изменение эпитопного состава ЛПС, а также возрастание его гидрофобности может наблюдаться также при недостатке кислорода или в кислой среде. Это показывает, что некоторые структурные модификации являются общим адаптивным ответом бактерий на физиологические изменения их микроокружения, которым может быть как почва, так и внутренняя среда растения.

Другие эпитопные изменения коррелируют с различными стадиями развития клубеньков. Эти изменения могут быть специфичными в отношении вида растений, а также типа образуемых клубеньков (детерминированный или недетерминированный) и определяться растительными факторами, например антоцианинами (Noel et al., 1996a). В клубеньках гороха изменения эпитопов О-цепей происходят при переходе бактерий в растительные клетки и при развитии бактериоидов. Именно на этих стадиях наблюдают нарушения симбиоза у ЛПС-мутантов, дефектных по структуре О-цепей.

Выяснение роли ЛПС и К-антигенов в развитии клубеньков — увлекательная область исследований. Выяснение функций этих поверхностных компонентов имеет важное значение для понимания не только развития азотфиксирующего симбиоза, но и общих функций этих молекул как факторов вирулентности при инфицировании эукариотических клеток грам-отрицательными бактериями.

V. Благодарности

Работа поддержана грантами NIH (GM895832, RWC), NSF (IBN9305022, RWC и BLR), Центром комплексных исследований углеводов растений и микроорганизмов, финансируемым DOE (DE-FG09-87ER13810, CCRC), Германским научным фондом (PO 117/16-1), университетом Тюбингена (ELK). Авторы признательны М. О'Neill и А. Perlick за плодотворное обсуждение, R. Nuri и А. Dunn за техническую помощь. Ряд сотрудников лаборатории RWC внес вклад в работу, описанную в этой статье: U. R. Bhat, T-B. Chen, D. Geller, B. Jeyaretnam, J. Kim, B. Krishnaiah, N. Price, B. Ridley.

VI. Литература

- Allaway D., Jeyaretnam B., Carlson R.W., Poole P.S. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 6403-6406.
 Bal A.K., Shantharam S., Verma D.P.S. (1980) *Can. J. Microbiol.* V. 26, p. 1096-1103.
 Balatti P.A., Pueppke S.G. (1990) *Plant Physiol.* V. 94, p. 1276-1281.
 Batchelor R.A., Alifano P., Biffali E., Hull S.I., Hull R.A. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 5228-5236.
 Battisti L., Lara J.C., Leigh J.A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 89, p. 5625-5629.
 Becquart-de Kozak I., Reuhs B.L., Buffard D., Breda C., Kim J.S., Esnault R., Kondorosi A. (1997) *Mol. Plant Microbe Interact.* V. 10, p. 114-123.
 Belunis C.J., Raetz C.R.H. (1992) *J. Biol. Chem.* V. 267, p. 9988-9997.
 Bhat U.R., Bhagyalakshmi S.K., Carlson R.W. (1991a) *Carbohydr. Res.* V. 220, p. 219-227.
 Bhat U.R., Carlson R.W. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 2230-2235.
 Bhat U.R., Carlson R.W., Busch M., Mayer H. (1991b) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 41, p. 213-217.
 Bhat U.R., Forsberg L.S., Carlson R.W. (1994) *J. Biol. Chem.* V. 269, p. 14402-14410.
 Bhat U.R., Mayer H., Yokota A., Hollingsworth R.I., Carlson R.W. (1991c) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 2155-2159.
 Bolanos L., Esteban E., De Lorenzo C., Fernandez-Pascual M., De Felipe M.R., Garate A., Bonilla I. (1994) *Plant Physiol.* V. 104, p. 85-90.
 Bolanos L., Brewin N.J., Bonilla I. (1996) *Plant Physiol.* V. 110, p. 1249-1256.
 Borisov A.Y., Morzhina E.V., Kulikova O.A., Tchetskova S.A., Lebsky V.K., Tikhonovich I.A. (1992) *Symbiosis.* V. 14, p. 297-313.

- Boulnois G.J., Roberts I.S. (1990) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* V. 150, p. 1-18.
- Boulnois G.J., Roberts I.S., Hodge R., Hardy K.R., Jann K.B., Timmis K.N. (1987) *Mol. Gen. Genet.* V. 208, p. 242-246.
- Boulnois G.J., Jann K. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 3, p. 1819-1823.
- Bradley D.J., Butcher G.W., Galfre G., Wood E.A., Brewin N.J. (1986) *J. Cell Sci.* V. 85, p. 47-61.
- Bradley D.J., Wood E.A., Larkins A.P., Galfre G., Butcher G.W., Brewin N.J. (1988) *Planta.* V. 173, p. 149-160.
- Breedveld M.W., Canter Cremers H.C.J., Batley M., Posthumus M.A., Zevenhuizen L.P.T.M., Wijffelman C.A., Zehnder A.J.B. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 750-757.
- Brewin N.J. (1991) *Annu. Rev. Cell Biol.* V. 7, p. 191-226.
- Brewin N.J., Wood E.A., Larkins A.P., Galfre G., Butcher G.W. (1986) *J. Gen. Microbiol.* V. 132, p. 1959-1968.
- Brink B.A., Miller J., Carlson R.W., Noel K.D. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 548-555.
- Brom S., Garcia de los Santos A., Stepkowsky T., Flores M., Davila G., Romero D., Palacios R. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 5183-5189.
- Bronner D., Sieberth V., Pazzani C., Roberts I.S., Boulnois G.J., Jann B., Jann K. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 5984-5992.
- Bronner D., Sieberth V., Pazzani C., Roberts I.S., Boulnois G.J., Jann B., Jann K. (1994) *J. Bacteriol.* 175, 5984-5992.
- Brozek K.A., Carlson R.W., Ractz C.R.H. (1996a) *J. Biol. Chem.* V. 271, p. 32126-32136.
- Brozek K.A., Hosaka K., Robertson A.D., Ractz C.R.H. (1989) *J. Biol. Chem.* V. 264, p. 6956-6966.
- Brozek K.A., Kadrmas J.L., Ractz C.R.H. (1996b) *J. Biol. Chem.* V. 271, p. 32112-32118.
- Brzoska P.M., Signer E.R. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 3235-3237.
- Carlson R.W. (1982) Surface chemistry. In: Nitrogen Fixation, Vol. 2, *Rhizobium*. W.J. Broughton, ed. Clarendon Press, Oxford. p. 199-234.
- Carlson R.W. (1984) *J. Bacteriol.* V. 158, p. 1012-1017.
- Carlson R.W., Garcia F., Noel K.D., Hollingsworth R.I. (1990) *Carbohydr. Res.* V. 195, p. 101-110.
- Carlson R.W., Hollingsworth R.L., Dazzo F.B. (1988) *Carbohydr. Res.* V. 176, p. 127-135.
- Carlson R.W., Kalembsa S., Turowski D., Pachori P., Noel K.D. (1987a) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 4923-4928.
- Carlson R.W., Krishniah B.S. (1992) *Carbohydr. Res.* V. 231, p. 205-219.
- Carlson R.W., Lee R.P. (1983) *Plant Physiol.* V. 71, p. 223-228.
- Carlson R.W., Reuhs B., Chen T.-B., Bhat U.R., Noel K.D. (1995) *J. Biol. Chem.* V. 270, p. 11783-11788.
- Carlson R.W., Sanders R.E., Napoli C., Albersheim P. (1978) *Plant Physiol.* V. 62, p. 912-917.
- Carlson R.W., Shatters R., Duh J.-L., Turnbull E., Hanley B., Rolfe B.G., Djordjevic M.A. (1987b) *Plant Physiol.* V. 84, p. 421-427.
- Carlson R.W., Yadav M. (1985) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 50, p. 1219-1224.
- Carrión M., Bhat U.R., Reuhs B., Carlson R.W. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 1725-1731.
- Cava J.R., Elias P.M., Turowski D.A., Noel K.D. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 8-15.
- Cava J.R., Tao H., Noel K.D. (1990) *Mol. Gen. Genet.* V. 221, p. 125-128.
- Cedergren R.A., Hollingsworth R.I. (1994) *J. Lipid Res.* V. 35, p. 1452-1461.
- Cedergren R.A., Lee J., Ross K.L., Hollingsworth R.I. (1995) *Biochemistry.* V. 34, p. 4467-4477.
- Cedergren R.A., Wang Y., Hollingsworth R.I. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 5529-5532.
- Chapman K., Pankratz S., Philip-Hollingsworth S., Dazzo F., Wright S. (1990) In: Nitrogen Fixation, Achievements and Objectives. P.M. Gresshoff et al. (eds). Chapman and Hall, New York, p. 254.
- Chen T.-B. (1987) The structure of the O-antigen from lipopolysaccharide of *Rhizobium leguminosarum* 128C53 and its nod fix mutant. (Abstract).
- Clementz T., Bednarski J., Ractz C.R.H. (1996) *J. Biol. Chem.* V. 271, p. 12095-12102.
- Clementz T., Zhou Z., Ractz C.R.H. (1997) *J. Biol. Chem.* V. 272, p. 10353-10360.
- Clover R.H., Kieber J., Signer E.R. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 3961-3967.
- Corzo J., Perez-Galdona R., Leon-Barrios M., Gutierrez-Navarro A.M. (1991) *Electrophoresis.* V. 12, p. 439-441.
- David S.A., Balasubramanian K.A., Mathan V.I., Balaran P. (1992) *Biochim. Biophys. Acta Lipids Lipid Metab.* V. 1165, p. 147-152.
- Dazzo F.B. (1979) *ASM News.* V. 45, p. 238-240.
- Dazzo F.B., Truchet G.L., Hollingsworth R.I., Hrabak E.M., Pankratz H.S., Philip-Hollingsworth S., Salzwedel J.L., Chapman K., Appenzeller L., Squartini A., Gerhold D., Orgambide G. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 5371-5384.
- De Maagd R.A., de Rijk R., Mulders I.H.M., Lugtenberg B.J.J. (1989a) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 1136-1142.
- De Maagd R.A., Rao A.S., Mulders I.H.M., Roo L.G., van Loosdrecht M.C.M., Wijffelman C.A., Lugtenberg B.J.J. (1989b) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 1143-1150.
- Denny T.P. (1995) *Annu. Rev. Phytopathol.* V. 33, p. 173-197.
- Djordjevic S.P., Chen H., Batley M., Redmond J.W., Rolfe B.G. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 53-60.
- Dodgson C., Amor P., Whitfield C. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 1895-1902.
- Dow J.M., Osbourn A.E., Wilson T.J.G., Daniels M.J. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 768-777.
- Duelli D.M., Noel K.D. (1997) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 10, p. 903-910.
- Eisenschenkel L., Diebold R., Perez-Lesher J., Peterson A.C., Peters N.K., Noel K.D. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 60, p. 3315-3322.
- Elkan G.H. (1992) *Can. J. Microbiol.* V. 38, p. 446-450.
- Finke A., Bronner D., Nikolaev A.V., Jann B., Jann K. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 4088-4094.
- Finke A., Jann B., Jann K. (1990) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 69, p. 129-134.
- Finke A., Roberts I., Boulnois G., Pazzani C., Jann K. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 3074-3079.
- Forsberg L.S., Carlson R.W. (1997) *J. Biol. Chem.* in press.

- Forsberg L.S., Reuhs B.L. (1997) *J. Bacteriol.* V. 179, p. 5366-5371.
- Foster J.W., Spector M.P. (1995) How *Salmonella* survive against the odds. 145. (Abstract).
- Franco A.V., Liu D., Reeves P.R. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 1903-1907.
- Freiberg C., Fellay R., Bairoch A., Broughton W.J., Rosenthal A., Perret X. (1997) *Nature*. V. 387, p. 394-401.
- García-de los Santos A., Brom S. (1997) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 10, p. 891-902.
- Galanos C., Luderitz O., Westphal O. (1969) *Eur. J. Biochem.* V. 9, p. 245. (Abstract).
- Gil-Serrano A.M., Gonzalez-Jimenez I., Mateo P.T., Bernabe M., Jimenez-Barbero J., Megias M., Romero-Vazquez M.J. (1995) *Carbohydr. Res.* V. 275, p. 285-294.
- Glowacka M., Russa R., Lorkiewicz Z. (1986) *Acta Microbiol. Pol.* V. 35, p. 199-205.
- Goldberg J.B., Pier G.B. (1996) *Trends in Microbiol.* V. 4, p. 490-494.
- Gonzales J.E., Reuhs B.L., Walker G.C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 93, p. 8636-8641.
- Goosen-de Roo L., de Maagd R.A., Lugtenberg B.J.J. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 3177-3183.
- Hollingsworth R.I., Carlson R.W. (1989a) *J. Biol. Chem.* V. 264, p. 9300-9303.
- Hollingsworth R.I., Carlson R.W., Garcia F., Gage D.A. (1989b) *J. Biol. Chem.* V. 264, p. 9294-9299.
- Hollingsworth R.I., Carlson R.W., Garcia F., Gage D.A. (1990) *J. Biol. Chem.* V. 265, p. 12752.
- Hollingsworth R.I., Zhang Y., Priefer U.B. (1994) *Carbohydr. Res.* V. 264, p. 271-280.
- Huguet E., Bonas U. (1997) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 10, p. 488-498.
- Icho T. (1988a) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 5117-5124.
- Icho T. (1988b) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 5110-5116.
- Jacques M. (1996) *Trends in Microbiol.* V. 4, p. 408-410.
- Jann B., Jann K. (1990) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* V. 150, p. 19-42.
- Jann K., Jann B. (1991) *Biochem. Soc. Trans.* V. 19, p. 623-628.
- Jarvis B.D.W., Downer H.L., Young J.P.W. (1992) *J. Syst. Bacteriol.* V. 42, p. 93-96.
- Johansen E., Finan T.M., Geftler M.L., Signer E.R. (1984) *J. Bacteriol.* V. 160, p. 454-457.
- Jordan C.D. (1984) Family III, Rhizobiaceae. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. N.R. Krieg, J.G. Holt, eds. Williams & Wilkins, Baltimore/London. p. 235-256.
- Kamberger W. (1979) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 6, p. 361-365.
- Kannenberg E.L., Brewin N.J. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 4543-4548.
- Kannenberg E.L., Brewin N.J. (1994a) *Trends in Microbiol.* V. 2, p. 277-283.
- Kannenberg E.L., Brewin N.J., Carlson R.W. (1994b) *Proc. 1st Europ. Nitrog. Fixat. Conf.* G.B. Kiss, G. Endre (eds.) Officina Press, Szeged, Hungary. p. 320.
- Kannenberg E.L., Forsberg L.S., Carlson R.W. (1996) *Plant and Soil*. V. 186, p. 161-166.
- Kannenberg E.L., Perotto S., Bianciotto V., Rathburn E.A., Brewin N.J. (1994c) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 2021-2032.
- Kannenberg E.L., Rathbun E.A., Brewin N.J. (1992) *Mol. Microbiol.* V. 6, p. 2477-2487.
- Kato G., Maruyama Y., Nakamura M. (1979) *Agric. Biol. Chem.* V. 43, p. 1085-1092.
- Kato G., Maruyama Y., Nakamura M. (1980) *Agric. Biol. Chem.* V. 44, p. 2843-2855.
- Kato G., Maruyama Y., Nakamura M. (1981) *Plant Cell Physiol.* V. 22, p. 759-771.
- Kijne J. (1990) In: *Biological Nitrogen Fixation*. G. Stacey, R.H. Burris, H.J. Evans (eds). Chapman and Hall, New York.
- Kijne J.W., Lugtenberg B.J.J., Smit G. (1992) In: *Molec. Sign. Plant-Microbe Commun.* D.P.S. Verma. (ed.) CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London. p. 281-294.
- Kim J.S., Reuhs B.L. (1996a) *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8th Int. MPMI Congr. (Abstract).
- Kim J.S., Reuhs B.L., Rahman M.M., Ridley B., Carlson R.W. (1996b) *Glycobiology*. V. 5, p. 433-437.
- Kiss E., Reuhs B.L., Kim J.S., Kereszt A., Petrovics G., Putnoky P., Dusha I., Carlson R.W., Kondorosi A. (1997) *J. Bacteriol.* V. 179, p. 2132-2140.
- Lagares A., Caetano-Anolles G., Niehaus K., Lorenzen J., Ljunggren H.D., Puhler A., Favelukes G. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 5941-5952.
- Latchford J.W., Borthakur D., Johnston A.W.B. (1991) *Mol. Microbiol.* V. 5, p. 2107-2114.
- Leeman A., Van Pelt J.A., Den Ouden P.M., Heinsbroek M., Bakker P.A.H.M., Schippers B. (1995) *Am. Phytopathol. Soc.* V. 85, p. 1021-1027.
- Lipsanen P., Lindstrom K. (1989) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 58, p. 323-328.
- Lloret J., Bolanos L., Lucas M.M., Peart J.M., Brewin N.J., Bonilla I., Rivilla R. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 61, p. 3701-3704.
- Loomis W.D., Durst R.W. (1992) *Biofactors*. V. 3, p. 229-239.
- Lopez-Lara I.M., Orgambide G., Dazzo F.B., Olivares J., Toro N. (1995) *Microbiology*. V. 141, p. 573-581.
- Lucas M.M., Peart J.L., Brewin N.J., Kannenberg E.L. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 2727-2733.
- Lynn W.A., Goldenbock D.T. (1992) *Immunol. Today*. V. 13, p. 271-276.
- Maier R.J., Brill W.J. (1978) *J. Bacteriol.* V. 133, p. 1295-1299.
- Martinez-Romero E. (1994) *Plant and Soil*. V. 161, p. 11-20.
- Martinez-Romero E., Caballero-Mellado J. (1996) *Crit. Rev. Plant Sci.* V. 15, p. 113-140.
- Mayer H., Bhat U.R., Masoud H., Radziejewska-Lebrecht J., Widemann C., Krauss J.H. (1989a) *Pure Appl. Chem.* V. 61, p. 1271-1282.
- Mayer H., Krauss J.H., Urbanik-Sypniewska T., Puvanesarajah V., Stacey G., Auling G. (1989b) *Arch. Microbiol.* V. 151, p. 111-116.
- Mayer H., Moreno E., Stackebrandt E., Dorsch M., Wolters J., Busch M. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 3569-3576.

- Mayer H., Weckesser J. (1984) In: Handbook of Endotoxins, Vol. 1, Chemistry of Endotoxins. E.T. Rietschel (ed.) Elsevier, Amsterdam, p. 221-247.
- Mazzucchi U. (1983) Recognition of Bacteria by Plants. In: Biochemical Plant Pathology. J.A. Callow (ed.) John Wiley & Sons Ltd, p. 299-324.
- Meinhardt L.W., Krishnan H.B., Balatti P.A., Pueppke S.G. (1993) Mol. Microbiol. V. 9, p. 17-29.
- Mohnen D., Hahn M.G. (1993) Cell Biology. V. 4, p. 93-102.
- Moran A.P., Appelmeik B.J., Aspinall G.O. (1996) J. Endotoxin Res. V. 3, p. 521-531.
- Morrison D.C., Jacobs D.M. (1976) Immunochemistry. V. 13, p. 813-818.
- Munns D.N. (1970) Plant and Soil. V. 32, p. 90-102.
- Neumann U., Mayer H., Schiltz E., Benz R., Weckesser J. (1995) Microbiology. V. 141, p. 2013-2017.
- Newman M.A., Daniels M.J., Dow J.M. (1995) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 8, p. 778-780.
- Nichaus K., Lorenzen J., Lagares A., Puhler A. (1994) A *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant effective on *Medicago sativa* (alfalfa) but ineffective on *Medicago truncatula*. 7th ISMPMI. (Abstract).
- Noel K.D. (1992) In: Molecular Signals in Plant-Microbe Communications. D.P.S. Verma. (ed.) CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, p. 341-357.
- Noel K.D., Duelli D.M., Neumann V.J. (1996a) Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul.
- Noel K.D., Duelli D.M., Tao H., Brewin N.J. (1996b) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 9, p. 180-186.
- Noel K.D., VandenBosch K.A., Kulpaca B. (1986) J. Bacteriol. V. 168, p. 1392-1401.
- O'Neill M.A., Warrenfeltz D., Kates K., Pellerin P., Doco T., Darvill A.G., Albersheim P. (1996) J. Biol. Chem. V. 271, p. 22923-22930.
- Olsen P., Wright S., Collins M., Rice W. (1994) Appl. Environ. Microbiol. V. 60, p. 654-661.
- Orskov F., Sharma V., Orskov I. (1984) J. Gen. Microbiol. V. 130, p. 2681-2684.
- Pavelka Jr. M.S., Wright L.F., Silver R.P. (1991) J. Bacteriol. V. 173, p. 4603-4610.
- Pavelka M.S., Hayes S.F., Silver R.P. (1994) J. Biol. Chem. V. 269, p. 20149-20158.
- Pazzani C., Roberts I., Boulnois G. (1991) Biochem. Soc. Trans. V. 19, p. 628-630.
- Pazzani C., Rosenow C., Boulnois G.J., Bronner D., Jann K., Roberts I.S. (1993) J. Bacteriol. V. 175, p. 5978-5983.
- Pazzani C., Rosenow C., Boulnois G.J., Bronner D., Jann K., Roberts I.S. (1994) J. Bacteriol. V. 175, p. 5978-5983.
- Penel C., Greppin H. (1996) Plant Physiol. Biochem. V. 34, p. 479-488.
- Perotto S., Brewin N.J., Kannerberg E.L. (1994) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 7, p. 99-112.
- Petit C., Rigg G.P., Pazzani C., Smith A., Sieberth V., Stevens M., Boulnois G., Jann K., Roberts I.S. (1995) Mol. Microbiol. V. 17, p. 611-620.
- Petrovics G., Putnoky P., Reuhs B., Kim J., Thorp T.A., Noel D., Carlson R.W., Kondorosi A. (1993) Mol. Microbiol. V. 8, p. 1083-1094.
- Poole P.S., Schofield N.A., Reid C.J., Drew E.M., Walshaw D.L. (1994) J. Gen. Microbiol. V. 140, p. 2797-2809.
- Preston A., Mandrell R.E., Gibson B.W., Apicella M.A. (1996) Crit. Rev. Microbiol. V. 22, p. 139-180.
- Price N.P.J., Jeyaretnam B., Carlson R.W., Kadmas J.L., Raetz C.R.H., Brozek K.A. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 92, p. 7352-7356.
- Price N.P.J., Kelly T.M., Raetz C.R.H., Carlson R.W. (1994) J. Bacteriol. V. 176, p. 4646-4655.
- Priefer U.B. (1989) J. Bacteriol. V. 171, p. 6161-6168.
- Proctor R.A., Denlinger L.C., Bertics P.J. (1995) In: Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. J.A. Roth et al. (eds). Amer. Soc. Microb. Washington, D.C. p. 173-194.
- Putnoky P., Grosskopf E., Ha D.T.C., Kiss G.B., Kondorosi A. (1988) J. Cell Biol. V. 106, p. 597-607.
- Putnoky P., Petrovics G., Kereszt A., Grosskopf E., Ha D.T.C., Banfalvi Z., Kondorosi A. (1990) J. Bacteriol. V. 172, p. 5450-5458.
- Raetz C.R.H. (1990) Annu. Rev. Biochem. V. 59, p. 129-170.
- Raetz C.R.H. (1993) J. Bacteriol. V. 175, p. 5745-5753.
- Rahman M.M., Guard-Petter J., Carlson R.W. (1997) J. Bacteriol. V. 179, p. 2126-2131.
- Reuhs B.L., Carlson R.W., Kim J.S. (1993) J. Bacteriol. V. 175, p. 3570-3580.
- Reuhs B.L., Geller D.G., Kim J.S., Fox J.F., Kolli V.S.K., Pueppke S.G. (1997) Appl. Environ. Microbiol., submitted.
- Reuhs B.L., Kim J.S., Badgett A., Carlson R.W. (1994a) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 7, p. 240-247.
- Reuhs B.L., Kim J.S., Geller D.A., Carlson R.W., Williams M.N.V., Pueppke S.G. (1994b) Mol. Plant-Microbe Interact. Edinburgh, 71. (Abstract).
- Reuhs B.L., Kim J.S., Matthyse A.G. (1997) J. Bacteriol. V. 179, p. 5372-5379.
- Reuhs B.L., Williams M.N.V., Kim J.S., Carlson R.W., Cote F. (1995) J. Bacteriol. V. 177, p. 4289-4296.
- Rietschel E.T., Brade L. et al. (1990) Adv. Exp. Med. Biol. V. 256, p. 81-100.
- Rietschel E.T., Brade H. (1992a) Sci. Am. V. 267, p. 54-61.
- Rietschel E.T., Brade L., Lindner B., Zahringer U. (1992b) In: Bact. Endotox. Lipopolysac. V. 1, Molec. Biochem. Cell. Biol. D.C. Morrison, J.L. Ryan (eds.) CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo. p. 3-41.
- Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U., Ulmer A.J., Holst O., Brade H., Schmidt G., Mamat U., Grimmecke H.-D., Kusumoto S., Zahringer U. (1993) Immunobiology. V. 187, p. 169-190.
- Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A.J., Zahringer U., Seydel U., Di Padova F., Schreier M., Brade H. (1994) FASEB J. V. 8, p. 217-225.
- Robertson J.G., Wells B., Brewin N.J., Wood E., Knight C.D., Downie J.A. (1985) In: Cell Surf. Plant Growth and Develop. K. Roberts et al. (eds.) p. 317-331.

- Rosenow C., Esumeh F., Roberts I.S., Jann K. (1995a) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 1137-1143.
- Rosenow C., Roberts I.S., Jann K. (1995b) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 125, p. 159-164.
- Roth L.E., Stacey G. (1989) *Europ. J. Cell Biol.* V. 49, p. 13-23.
- Roth L.E., Stacey G. (1991) In: *Microbial Cell-Cell Interactions*. M. Dworkin (ed.) Amer. Soc. Microbiol., Washington, D.C. p. 255-301.
- Russa R., Luderitz O., Rietschel E.T. (1985) *Arch. Microbiol.* V. 141, p. 284-289.
- Russa R., Urbanik-Sypniewska T., Choma A., Mayer H. (1991) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 84, p. 337-344.
- Russa R., Bruneteau M., Shashkov A.S., Urbanik-Sypniewska T., Mayer H. (1996) *Arch. Microbiol.* V. 165, p. 26-33.
- Russa R., Urbanik-Sypniewska T., Lindstrom K., Mayer H. (1995) *Arch. Microbiol.* V. 163, p. 345-351.
- Saier M.H., Jr. (1994) *Microbiol. Rev.* V. 58, p. 71-93.
- Schletter J., Holger H., Ulmer A.J., Rietschel E.T. (1995) *Arch. Microbiol.* V. 164, p. 383-389.
- Schnaitman C.A., Klena J.D. (1993) *Microbiol. Rev.* V. 57, p. 655-682.
- Schwedock J.S., Long S.R. (1992) *Genetics*. V. 132, p. 899-909.
- Segovia L., Young J.P.W., Martinez-Romero E. (1993) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 43, p. 374-377.
- Selbitschka W., Arnold W., Priefer U.B., Rottschäfer T., Schmidt M., Simon R., Puhler A. (1991) *Mol. Gen. Genet.* V. 229, p. 86-95.
- Sequeira L. (1983) *Annu. Rev. Microbiol.* V. 37, p. 51-79.
- Sethi R.S., Reporter M. (1981) *Protoplasma*. V. 105, p. 321-325.
- Silver R.P., Aaronson W., Vann W.F. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 5489-5495.
- Sindhu S.S., Brewin N.J., Kannenberg E.L. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 1804-1813.
- Sirisena D.M., Brozek K.A., MacLachlan P.R., Sanderson K.E., Raetz C.R.H. (1992) *J. Biol. Chem.* V. 267, p. 18874-18884.
- Stacey G., So J.-S., Roth L.E., Bhagya Lakshmi S.K., Carlson R.W. (1991) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 4, p. 332-340.
- Stevenson G., Kessler A., Reeves P.R. (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 125, p. 23-30.
- Stevenson T.T., Darvill A.G., Albersheim P. (1988) *Carbohydr. Res.* V. 179, p. 269-288.
- Sutton W.D., Pankhurst C.E., Craig A.S. (1981) In: *Intern. Rev. Cytol.* G.H. Bourne et al. (eds.) Academic Press, New York, p. 149-177.
- Takada H., Kotani S. (1992) In: *Bact. Endotox. Lipopolysac.* V. 1, Molec. Biochem. Cell. Biol. D.C. Morrison, J.L. Ryan (eds.) CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo. p. 107-134.
- Tao H., Brewin N.J., Noel K.D. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 2222-2229.
- Urbanik-Sypniewska T., Seydel U., Greek M., Weckesser J., Mayer H. (1989) *Arch. Microbiol.* V. 152, p. 527-532.
- Vaara M. (1992) *Microbiol. Rev.* V. 56, p. 395-411.
- Valvano M.A. (1992) *Can. J. Microbiol.* V. 38, p. 711-719.
- Valverde C., Hozbor D.F., Lagares A. (1997) *BioTechniques*. V. 22, p. 230-232.
- Van Brussel A.A.N., Planque K., Quispel A. (1977) *J. Gen. Microbiol.* V. 101, p. 51-56.
- Van de Wiel C., Norris J.H., Bochenek B., Dickstein R., Bisseling T., Hirsch A.M. (1990) *Plant Cell*. V. 2, p. 1009-1017.
- Van Putten J.P.M. (1993) *EMBO J.* V. 12, p. 4043-4051.
- Van Spronsen P.C., Bakhuizen R., van Brussel A.A.N., Kijne J.W. (1994) *Eur. J. Cell Biol.* V. 64, p. 88-94.
- Van Worum W.A.T., van Brussel A.A.N., Tak T., Wijffelman C.A., Kijne J.W. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 278-285.
- VandenBosch K.A., Brewin N.J., Kannenberg E.L. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 4537-4542.
- Verma D.P.S., Hong Z. (1996) *Trends in Microbiol.* V. 4, p. 364-368.
- Wang Y., Hollingsworth R.I. (1994) *Carbohydr. Res.* V. 260, p. 305-317.
- Weibgen U., Russa R., Yokota A., Mayer H. (1993) *Syst. Appl. Microbiol.* V. 16, p. 177-182.
- Werner D. (1992) In: *Biological Nitrogen Fixation*. G. Stacey et al. (eds.) Chapman & Hall, New York. p. 399-431.
- Westphal O., Jann K. (1965) *Meth. Carbohydr. Chem.* V. 5, p. 83-91.
- Whatley M.H., Bodwin J.S., Lippincott B.B., Lippincott L.A. (1970) *Infect. Immun.* V. 13, p. 1080-1083.
- Whatley M.H., Spiess L.D. (1977) *Plant Physiol.* V. 60, p. 765-766.
- Whitfield C. (1995) *Trends in Microbiol.* V. 3, p. 178-185.
- Whitfield C., Valvano M.A. (1993) *Adv. Microb. Physiol.* V. 35, p. 136-246.
- Williams M.N.V., Hollingsworth R.I., Brzoska P.M., Signer E.R. (1990a) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 6596-6598.
- Williams M.N.V., Hollingsworth R.I., Klein S., Signer E.R. (1990b) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 2622-2632.
- Witty J.F., Minchin F.R., Skot L., Sheehy J.E. (1986) In: *Oxford Surv. Plant Molec. & Cell Biol.* B.J. Mifflin (ed.) Oxford University Press, New York. p. 275-314.
- Woese C.R. (1987) *Microbiol. Rev.* V. 51, p. 221-271.
- Wolpert J.S., Albersheim P. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 70, p. 729 (Abstract).
- Wood E.A., Butcher G.W., Brewin N.J., Kannenberg L. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 4549-4555.
- Wright S.F. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 56, p. 2262-2264.
- Wunder D.E., Aaronson W., Hayes S.F., Bliss J.M., Silver R.P. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 4025-4033.
- Yanagi M., Yamasato K. (1993) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 107, p. 115-120.
- Young J.P.W., Haukka K.E. (1996) *New Phytol.* V. 133, p. 87-94.
- Zevenhuizen L.P.T.M., Posthumus M.A., Scholten-Koerselman H.J. (1980) *Arch. Microbiol.* V. 125, p. 1-8.
- Zevenhuizen L.P.T.M., van Neeven A.R.W. (1983) *Carbohydr. Res.* V. 124, p. 166-171.
- Zhang Y., Hollingsworth R.I., Priefer U.B. (1992) *Carbohydr. Res.* V. 231, p. 261-271.

Почвенная биология *Rhizobiaceae*

Садовски М., Грэм П.

I.	Введение.....	179
II.	Почвенные популяции ризобий и их разнообразие.....	180
III.	Выживание ризобий в почве и ризосфере.....	182
IV.	Влияние бобового хозяина на почвенные популяции ризобий.....	182
	IV.A. Предпочтительное образование клубеньков.....	183
	IV.B. Ограничение образования клубеньков.....	184
V.	Влияние биотических и абиотических факторов на ризобии в почве.....	185
	V.A. Кислотность.....	185
	V.B. Температура.....	186
	V.C. Водный режим.....	186
	V.D. Трофические факторы.....	187
VI.	Конкуренция в почве и ризосфере.....	188
	VI.A. Генетика конкуренции за образование клубеньков.....	189
	VI.A.1. Свойства клеточной поверхности.....	189
	VI.A.2. Подвижность.....	190
	VI.A.3. Антибиоз.....	190
	VI.A.4. Эффективность клубенькообразования.....	190
	VI.A.5. Симбиотическая эффективность.....	190
	VI.A.6. Неохарактеризованные факторы.....	190
	VI.B. Роль плазмид в определении конкурентоспособности.....	191
VII.	Литература.....	191

I. Введение

Семейство *Rhizobiaceae* включает 6 родов бактерий, взаимодействующих с растениями: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Agrobacterium*, *Phyllobacterium*. Недавно было предложено выделить 7-й род *Mesorhizobium* (Young, Haukka, 1996; Jarvis et al., 1997). В определителе Берджи (Kerstens, De Ley, 1984) первые 4 рода отделяют от *Agrobacterium* и *Phyllobacterium* на основании способности формировать на корнях или стеблях растений семейства *Leguminosae* клубеньки, в которых атмосферный азот восстанавливается в аммиак. Многие представители рода *Agrobacterium* являются патогенами, способными формировать новообразования (опухоли) или вызывать аномальный рост корней у различных растений.

Недавно полученные данные затрудняют такое разделение семейства *Rhizobiaceae*. Так, штаммы *Agrobacterium*, в которые были перенесены некоторые плазмиды *Rhizobium*, приобрели способность формировать клубеньки на *Phaseolus vulgaris* (Martinez et al., 1987). Получены данные в пользу того, что *A. rhizogenes* должен быть объединен с *R. tropici*, *R. galegae* и *A. vitis*. *A. tumefaciens* активно изучали на способность формировать корончатые галлы у двудольных (Kado, 1991; Нооукаас, Schilperoort, 1992; Winans, 1992) и трансформировать различные растения (Christou, 1997). По генетике и физиологии образования опухолей *A. tumefaciens* поведено множество работ, однако об их почвенной биологии известно очень мало. Хотя было показано, что выживание *A. tumefaciens* в почве и бессимптомное поддержание в тканях растений может вызывать внезапные вспышки болез-

ни (Schroth et al., 1971; Bouzar et al., 1987; Burr et al., 1995), в почве часто обнаруживаются неопухолеобразующие агробактерии (Burr et al., 1987). Недавно для выявления и определения численности *A. tumefaciens* в почве была применена методика полимеразной цепной реакции (Picard et al., 1992; Haas et al., 1995), а также использованы специфические праймеры для выявления Ti-и Ri-плазмид фитопатогенных штаммов (Sawada et al., 1995).

Представители родов *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* (мы будем называть их ризобиями) не являются обычными почвенными организмами, поскольку в дополнение к нормальной стадии свободноживущих гетеротрофов, в их жизненном цикле присутствует стадия симбиотического взаимодействия с бобовыми растениями. Такая “двойная жизнь” ставит перед бактериями много проблем, но открывает и дополнительные возможности. Когда новая бобовая культура впервые высевается в почву, специфичные штаммы ризобий обычно немногочисленны и для обеспечения высокого уровня фиксации азота (N_2) необходима искусственная инокуляция, которая, как правило, приводит к существенному возрастанию урожая (Abel, Erdman, 1964; Diatloff, 1977; Graham, 1985; Date, 1991; Roughley et al., 1993). Однако вне зависимости от того, проводилась ли инокуляция, после нескольких лет выращивания бобовой культуры в почве формируются многочисленные популяции специфичных ризобий. После этого искусственная инокуляция обеспечивает лишь небольшое увеличение числа клубеньков и прибавка урожая наблюдается далеко не всегда (Ham, 1978; Ellis et al., 1984; Berg et al., 1988; Date, 1991). Поскольку многие почвенные штаммы ризобий обладают невысокой эффективностью, взаимодействующее с ними растение не может реализовать полностью свой потенциал продуктивности (Gibson et al., 1975; Ham, 1978; Guar, Lowther, 1980; Singleton, Tavares, 1986). Несмотря на интенсивные исследования последних лет, мы только сейчас начинаем понимать, какие факторы обеспечивают выживание ризобий в почве и их конкуренцию за образование клубеньков. В этом обзоре рассмотрены биотические и абиотические факторы, определяющие выживание клубеньковых бактерий в почве, а также свойства хозяина и микросимбионта, которые важны для конкуренции за клубенькообразование.

II. Почвенные популяции ризобий и их разнообразие

Ризобии составляют относительно небольшую часть почвенных бактерий. Показано, что штаммы *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* составляют 0.1–8.0% от числа бактерий в ризосфере и 0.01–0.14% от их биомассы (Bottomley, 1992; Brockwell et al., 1995; Schortemeyer et al., 1997). Сравнение количества бактерий, выявляемого путем инокуляции разведениями с использованием метода наибольшего правдоподобия (MPN), чашечного подсчета и иммунофлуоресцентного анализа показало, что не все ризобии являются инфекционными. Описаны не образующие клубеньков штаммы *R. leguminosarum* (Soberon-Chavez, Najera, 1989), а из ризосферы *Lotus corniculatus* выделены неvirulentные штаммы ризобий лядвенца (Sullivan et al., 1996). Некоторые почвенные бактерии, не являющиеся ризобиями, приобретают способность к образованию клубеньков при переносе в них *nod*-генов (Jarvis et al., 1989). Показано, что перенос плазмид между штаммами в почве играет важную роль в формировании структуры популяций, приводя к появлению симбиотических свойств у неvirulentных ризобий (Kinkle, Schmidt, 1990). В случае *R. loti* это может достигаться путем переноса симбиотических генов, расположенных на хромосоме (Sullivan et al., 1995).

Ризобии могут попадать в почву в составе коммерческих инокулятов, распространяться по воздуху, с семенами или поддерживаться в качестве симбионтов местных бобовых. При инокуляции количество попадающих в почву ризобий варьирует в зависимости от размера семян, густоты посева и метода инокуляции. Высококачественные инокулянты обеспечивают попадание $2.5 \cdot 10^3$ – $1.0 \cdot 10^6$ клеток на 1 семя (Vincent, 1970; FAO, 1991; Somasegaran, Hoben, 1994). Это соответствует внесению приблизительно клеток $8 \cdot 10^{10}$ ризобий на 1 га для фасоли и сои, тогда как в случае подземного клевера вносится приблизительно $6 \cdot 10^{10}$ клеток на 1 га (Brockwell, Bottomley, 1995). При использовании гранулированных инокулятов ризобий клевера в условиях орошения это число может быть еще большим ($5 \cdot 10^{11}$ – $2.6 \cdot 10^{15}$ клеток ризобий на 1 га) (Smith et al., 1981; Smith, del Rio Ecurra, 1982; Ciafardini, Lombardo, 1991; Smith, 1992; Gault et al., 1994). Поэтому неудиви-

тельно, что внесенные штаммы часто доминируют при нодуляции в первый год использования новой культуры (Gibson et al., 1976; Brockwell et al., 1982; Singleton, Tavares, 1986). Число ризобий в почве при этом быстро растет за счет их выхода из отмирающих клубеньков (Sutton, 1983; McDermott et al., 1987). Во многих случаях это обеспечивает доминирование штаммов-инокулятов первые 5-15 лет после исходной инокуляции (Diatloff, 1977; Brunel et al., 1988; Lindstrom et al., 1990).

Однако не все вновь высеваемые бобовые подвергаются инокуляции и она не всегда производится правильно. В этих случаях загрязнение через семена, почву и воздух приводит к появлению первых бактерий в течение 4-5 лет, после чего начинается постепенное увеличение численности популяции. Число ризобий в почве в зависимости от факторов, которые будут рассмотрены ниже, может меняться в пределах $10^2 - 10^7$ клеток на 1 г (Ellis et al., 1984; Singleton, Tavares, 1986; Triplett et al., 1993; Slattery, Coventry, 1993; Strain et al., 1994; Roughley et al., 1995; Brockwell, Bottomley, 1995; Carter et al., 1995; Hirsch, 1996). Большинство полевых и экологических исследований, направленных на подсчет и изучение разнообразия этих организмов, проводится путем разведения почвенных суспензий и выделения ризобий из клубеньков, образовавшихся в лабораторных условиях (Somasegaran, Hoben 1994). Эта процедура может привести к недооценке количества и разнообразия ризобий в почве (Dye et al., 1995). Кроме того, растения, используемые для выделения ризобий, могут обладать предпочтительностью к определенным штаммам, имеющимся в популяции (Kumar Rao et al., 1981; Bottomley et al., 1994; Bromfield et al., 1995; Keatinge et al., 1995; van Berkum et al., 1995; Brunel et al., 1996). Для некоторых видов ризобий предложены селективные среды, которые могут быть использованы для прямого выделения штаммов из почвы (Gault, Schwinghamer, 1993; Tong, Sadowsky, 1993). Большой интерес представляет изучение ДНК, выделенной непосредственно из почвы (Streit et al., 1993). Последние методы в настоящее время привлекают все большее внимание для изучения размера и разнообразия популяций. Для решения этих задач весьма полезными могут оказаться и генетически маркированные штаммы (Watson, 1995; Wilson et al., 1995; Hirsch, 1996).

Интерес к разнообразию почвенных популяций ризобий возрос в последние годы в связи с развитием новых методов идентификации и таксономии, в частности полифазной таксономии ризобий (Graham et al., 1991). Используемые методы включают анализ состава плазмид (van Berkum et al., 1995) и серологические методы, в том числе использование методик ELISA (Sadowsky et al., 1987a; Leung et al., 1994; Madrzak et al., 1995; van Berkum et al., 1995). Изучается полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP) в сочетании с ДНК-пробами (Lindstrom et al., 1990; Sadowsky et al., 1990; Hirsch et al., 1993; Thomas et al., 1994; Nour et al., 1995; Anyango et al., 1995; Bromfield et al., 1995; Demezas et al., 1995; Madrzak et al., 1995; Sullivan et al., 1996), с методиками REP, ERIC или другими вариантами PCR (Judd et al., 1993; de Bruijn, 1993; Madrzak et al., 1995; Richardson et al., 1995; Brunel et al., 1996; Sadowsky, Hur, 1996), или же с методикой RAPD (Dye et al., 1995; Paffetti et al., 1996; Rome et al., 1996). Традиционно проводится мультилокусный электрофорез ферментов, MLEE (Pinero et al., 1988; Eardly et al., 1990; Demezas et al., 1991, 1995; Bottomley et al., 1994; Dupuy et al., 1994; Leung et al., 1994; Souza et al., 1994; Strain et al., 1994, 1995) и SDS-PAGE анализ белков и липосахаридов (Roberts et al., 1980; Sadowsky et al., 1987b; Dupuy et al., 1994). Популяционное разнообразие ризобий часто оказывается максимальным в центрах происхождения соответствующих растений-хозяев (Lie et al., 1987). При изучении 51 изолята *Rhizobium etli*, выделенного из центрально-американского центра происхождения фасоли (*Phaseolus vulgaris*) выявлена величина коэффициента генетического разнообразия 0.691. Данная величина выше, чем это было показано для других видов бактерий. Из клубеньков разных видов фасоли было выделено 372 штамма ризобий фасоли, которые разделили на 7 кластеров, включающих 95 электрофоретических типов (ЭТ). Бактерии, выделенные из дикорастущих растений *Phaseolus vulgaris* и *P. coccineus*, формировали отдельную группу, тогда как ризобии из культурной фасоли оказались очень гетерогенными (Souza et al., 1994). Почвы, из которых выделяли эти штаммы, содержали в 40 раз больше неинфекционных, чем инфекционных штаммов ризобий (Segovia et al., 1991). Неинфекционные штаммы были разделены на 4 кластера и 85 электрофоретических типов (ЭТ), причем структура популяции инфекционных и неинфекционных штаммов, изученная на основе MLEE, а также с использованием RFLP на гены рРНК, оказалась сходной.

В аналогичном исследовании популяции *Sinorhizobium meliloti*, происходящей из почв Азии и Ближнего Востока, были выявлены две филогенетические линии, существующие в пределах одного вида. Это разделение, подтвержденное другими авторами (Gordon et al., 1995; Brunel et al., 1996; Paffetti et al., 1996), может быть связано со специфичностью к разным растениям и с устойчивостью к кислой почве.

Достаточно разнообразные почвенные популяции ризобий могут формироваться в ассоциации с растениями, которые не являются характерными для данного региона. Среди 200 штаммов *R. leguminosarum*, выделенных в Орегоне, обнаружено 53 ЭТ, формирующих 7 кластеров (Leung et al., 1994). Из клубеньков фасоли во Франции выделено 287 штаммов ризобий, сгруппированных в 40 различных групп на основании состава плазмид, причем среди этих штаммов могут быть выделены два вида (Amarger et al., 1994). Культивируемый вид растений также может оказывать воздействие на почвенную популяцию. Хотя изученные в большинстве работ популяции ризобий проявляли клональную структуру, между отдельными их группами возможна рекомбинация (Demezas et al., 1995; Sullivan et al., 1995), включающая перенос как плазмид (Young, Wexler, 1988; Jarvis et al., 1989; Kinkle, Schmidt, 1990; Thomas et al., 1994), так и хромосомных генов (Sullivan et al., 1995).

III. Выживание ризобий в почве и ризосфере

В литературе имеется много сообщений о том, что ризобии, интродуцированные в почву в качестве инокулятов, уже через 2-3 года не удается выделить из клубеньков. Так, было изучено образование клубеньков на первый и второй год после интродукции 19 штаммов *R. leguminosarum* bv. *trifolii* в почву, не содержащую местных ризобий этого вида (Brockwell et al., 1982). Оказалось, что в первый год штаммы образуют более 80% клубеньков, а на второй год 19-94% клубеньков (остальные клубеньки формировали местные штаммы). Таким образом, даже при очень благоприятных условиях интродуцированные штаммы не всегда проявляют способность формировать симбиоз. Сходные результаты были получены при инокуляции *Desmodium* (Date, 1991) и *Phaseolus vulgaris* (Vlassak et al., 1996). Однако невозможность выделить штамм из клубеньков еще не говорит о том, что он отсутствует в почве. Сравнение двух популяций *S. meliloti*, выделенных из клубеньков и непосредственно из почвы, показало, что частоты некоторых генотипов существенно различаются (Bromfield et al., 1995).

Очевидно, что эти эффекты могут быть связаны с различным действием биотических и абиотических факторов на определенные штаммы ризобий. Это следует из данных о сниженной выживаемости бактерий на второй год после инокуляции (Marshall et al., 1963; Chatel, Parker, 1973), о варьировании жизнеспособности *S. meliloti* в кислых почвах Юго-Западной Австралии (Howieson, Ewing, 1986) и об инокуляции *Vicia faba* (Carter et al., 1995). Однако индивидуальная чувствительность штаммов к стрессам еще не объясняет всех различий в их встречаемости в почве. Данные о том, что специфические штаммы-инокулянты могут сохраняться в почве, получены рядом авторов (Diatloff, 1977; Brunel et al., 1988; Lindstrom et al., 1990; Sanginga et al., 1994). Для описания способности штаммов сохраняться длительное время в почве был предложена термин "сапрофитная компетентность" (Chatel et al., 1968). К сожалению, имеется очень мало данных о том, какие свойства бактерий могут отвечать за этот признак. Была выявлена корреляция между электрофоретическим зарядом поверхности *Bradyrhizobium* и содержанием пирофосфат-обменного железа в почве, а также кислотностью почвы (Bushby, 1990). Скорость, с которой численность интродуцированных штаммов *B. japonicum* приходила к равновесному состоянию, зависит от типа почвы (Croizat et al., 1982, 1987; Corman et al., 1987). Ниже будет обсуждаться способность ризобий к деградации ароматических веществ, которая не коррелирует с их выживаемостью (Rynne et al., 1994).

IV. Влияние бобового хозяина на почвенные популяции ризобий

Бобовое растение-хозяин может существенно влиять на судьбу ризобий в почве (Bottomley, 1992). Это может быть обусловлено: а) относительно неспецифическим эффектом корневых экссудатов, метаболизируемых ризобиями, б) размножением ризобий в клубеньках с последующим

выходом в почву, в) способностью растения “выбирать” определенные генотипы ризобий из почвенной популяции. Хотя штаммы *Rhizobium* и *B. japonicum* могут длительно существовать в почве в отсутствие хозяина (Weaver et al., 1972; Brunel et al., 1988; Kucey, Hynes, 1989; Bottomley, 1992; Slattery, Coventry, 1993; Sanginga et al., 1994), было показано влияние хозяина на специфические биотипы *Rhizobium*. Например, в присутствии растений гороха популяция *R. leguminosarum* bv. *viciae* на 3 порядка более многочисленна, чем популяция *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Kucey, Hynes, 1989). Однако, на соседнем поле, засеянном фасолью, ситуация была обратной. Аналогичные данные получены при анализе распределения штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae* и *R. leguminosarum* bv. *trifolii* под клевером и викой (Bottomley, 1992). Данные о том, являются ли условия ризосферы бобового растения селективными для специфичных к нему ризобий, противоречивы. Доказательством такой селективности является то, что штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae* могут использовать гомосерин, находящийся в эксудатах гороха (van Egeraat, 1975; Woormer et al., 1988). Степень специфичности по отношению к условиям ризосферы варьирует у разных организмов. В условиях Ротамстедской станции выживаемость *R. leguminosarum* в отсутствие хозяина находится на уровне 10^4 – 10^6 клеток на г почвы (Hirsch, 1996). В то же время, присутствие в почве *S. meliloti* более сильно зависит от хозяина (Triplett, 1993; Hirsch, 1996). При севообороте сои с небобовыми культурами (рапс, тритикале) в течение 4 лет не было выявлено существенного снижения титра штаммов *B. japonicum* в отсутствие хозяина (Triplett et al., 1993; Roughley et al., 1995). Столь длительное выживание может быть связано с защитным действием полисахаридов (Streeter et al., 1995), хотя эти вещества и не являются стабильными в условиях почвы.

IV.A. ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНОЕ ОБРАЗОВАНИЕ КЛУБЕНЬКОВ

В ряде работ показана различная степень предпочтительности растений по отношению к находящимся в почве штаммам ризобий. Выше упоминались работы о наличии двух разных геномных видов, вступающих в симбиоз с *Medicago*. Из клубеньков *M. polymorpha*, *M. truncatula*, *M. rigidula*, *M. orbicularis*, *M. minima*, использованных как растения-ловушки, выделили штаммы *S. meliloti*, которые охарактеризовали с использованием метода PCR-RFLP (Brunel et al., 1996). Были выявлены две различающиеся группы, представители одной из которых (R1) формировали рудиментарные клубеньки на *M. polymorpha* и нормальные клубеньки на остальных хозяевах. Представители другой группы (R2) формировали эффективный симбиоз с *M. polymorpha*, но неэффективный симбиоз с *M. rigidula*. Различия между этими группами были выявлены и при анализе инсерционных (IS) последовательностей в штаммах *Sinorhizobium*, выделенных из клубеньков *M. sativa*, *Melilotus alba*, а также из почвы (Bromfield et al., 1995). Среди 95 штаммов *Bradyrhizobium*, выделенных из клубеньков *Lupinus* и *Ornithopus*, выявлено 17 ЭТ, причем 73% штаммов относятся к двум близким ЭТ, выделенным из белого люпина, сераделлы и сиратро. Штаммы третьего ЭТ доминировали в клубеньках голубого люпина. Ранее были выявлены различия между видами люпина по отзывчивости на инокуляцию штаммами брадиризобий, выделенными в Юго-Западной Австралии (Lange, Parker, 1960a, 1960b). При изучении штаммов брадиризобий, вступающих в симбиоз с *Amphicarpa bracteata* (биотипы С и S), был найден только один ЭТ, специфичный для обоих биотипов растений. Три ЭТ практически не формировали клубеньков на растениях биотипа S (Spoerke et al., 1996). Ранее резкие различия по способности формировать клубеньки и фиксировать азот были выявлены между 8 популяциями этого растения, собранными в штатах Нью-Йорк, Иллинойс и Вирджиния. При этом штаммы брадиризобий обеспечивали формирование более высокой (на 39%) биомассы у растений, которые происходили из того же географического региона (Parker, 1995). Выявлена специфичность *Lotus corniculatus* по отношению к штаммам *R. loti*, выделенным из разных природных популяций (Lieven-Antoniou, Whittam, 1997).

Выявление комбинаций генотипов партнеров, в которых предпочтение хозяина выражается в высоком присутствии штамма-инокулята в клубеньках, может быть использовано в коммерческих целях. Так, были выявлены существенные различия между тремя формами *Trifolium repens* по их предпочтению к определенным штаммам ризобий, а также по реакции на температуру и кислотность. Оказалось, что варьирование обусловлено в основном влиянием генотипа

растений (Hardarson, Jones, 1979a, 1979b; Jones, Hardarson, 1979). Сорт фасоли RAB39, который одинаково хорошо образует клубеньки со штаммами UMR1632 *R. etli* и UMR1899 *R. tropici*, когда каждый из них вносили по отдельности, проявляли строгую избирательность при совместной инокуляции (Montealegre et al., 1995; Montealegre, Graham, 1996). Эта предпочтительность мало зависела от температуры и кислотности и проявлялась даже тогда, когда UMR1899 вносили на 8 часов позднее, чем UMR1632. Предпочтительная инокуляция была выявлена также для *Medicago* (Hardarson et al., 1981, 1982; Materon, 1994) и *Cicer* (Chandra, Parker, 1985). Ведутся активные поиски тропических сортов сои, способных к симбиозу с широким спектром местных почвенных штаммов *Bradyrhizobium* (Nangju, 1980; Pulver et al., 1982; Sanginga et al., 1996).

IV.B. ОГРАНИЧЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ КЛУБЕНЬКОВ

В дополнение к избирательности заражения, растения обладают способностью ограничивать образование клубеньков некоторыми штаммами ризобий. Это определяет, какие штаммы освобождаются в почву после отмирания клубеньков. Преимущественное образование клубеньков неэффективными или эффективными штаммами ризобий может быть использовано как способ контроля конкуренции за клубенькообразованием (Cregan, Keyser, 1986; Fobert et al., 1991).

Одним из первых выявленных случаев ограниченного клубенькообразования было взаимодействие европейских штаммов *R. leguminosarum* bv. *viceae* с горохом (*Pisum sativum*) сорта Афганистан (Lie, 1978). Большинство европейских штаммов не вступает в симбиоз с этим сортом, тогда как штамм TOM образует эффективный симбиоз. Затем было показано, что штаммы, выделенные из почв Ближнего Востока, как правило, могут формировать клубеньки на горохе Афганистан (Winarno, Lie, 1979; Ma, Iyer, 1990). У данного сорта выявлен рецессивный ген *sym2*, который ограничивает восприимчивость к заражению европейскими штаммами (Holl, 1975; Lie, 1984). У штамма TOM выделен и клонирован ген *nodX*, который позволяет преодолевать устойчивость к заражению афганского гороха (Davis et al., 1988).

Контролируемое хозяином ограничение образования клубеньков описано и в системе "клевер - *R. leguminosarum* bv. *trifolii*" (Gibson, 1968; Gibson, Brockwell, 1968). Штамм TA1 формирует симбиоз с большинством сортов клевера, однако невирулентен на сорте Woogenellup. У этого сорта выявлен рецессивный ген *rw1*, который ограничивает заражение штаммом TA1 (Lewis-Henderson, Djodjevic, 1991). У данного штамма выявлены два гена, *nodM* и *csn-1*, которые взаимодействуют с растительным геном, определяя специфичность клубенькообразования. Позднее у *Phaseolus vulgaris*, линии G21117 и G10002, выявлена ограниченная заражаемость несколькими штаммами *R. etli* (Montealegre, Kipe-Nolt, 1994).

Сходная сортовая или генотипическая специфичность выявлена для взаимодействия сои с *B. japonicum*. Определяемое хозяином ограничение клубенькообразования проявляется на уровне штамма или серогруппы. Например, у сои рецессивный ген *rj_p*, а также гены *rj₅* и *rj₆*, ограничивают образование клубеньков всеми брадиризованиями. В то же время, доминантные гены *Rj₂*, *Rj₃* и *Rj₄* ограничивают образование клубеньков штаммами *B. japonicum* серогрупп 122 и C1, 33 и 61, а также 123, соответственно (Vest et al., 1973; Devine et al., 1990; Sadowsky et al., 1992). Показано, что единичный рецессивный ген *Glycine max* (линия PI417566) ограничивает образование клубеньков штаммом USDA110 *B. japonicum*, а у других штаммов выявлен ген *noeD*, который позволяет нодулировать этот генотип сои (Lohrke et al., 1995). Обусловленное хозяином ограничение образования клубеньков определяется единичным геном сорта Peking (Ferrety et al., 1994), однако наследование этой аллели пока не изучено. Данные эффекты не ограничены штаммами *B. japonicum*: штамм USDA257 *S. fredii* нодулирует примитивные линии сои, но не способен к симбиозу с селекционными сортами, такими как McCall (Heron et al., 1989). У *S. fredii* выявлены гены *nolC* (Krishnan, Rueppke, 1991) и *nolBTUVW* (Meinhart et al., 1993), которые предотвращают образование клубеньков на сорте McCall, а у хозяина имеется доминантный ген, контролирующий симбиотическое взаимодействие (Trese, 1995).

V. Влияние биотических и абиотических факторов на ризобии в почве

V.A. КИСЛОТНОСТЬ

Повышенная кислотность почвы ограничивает возделывание растений приблизительно на 25% посевных площадей (Munns, 1986), причем эта доля имеет тенденцию к увеличению в странах третьего мира, где в сельское хозяйство часто вовлекаются малопригодные земли (Vance, Graham, 1995). Высокая кислотность снижает выживание ризобий в почве и на семенах, ухудшает прикрепление бактерий к инфицируемым корневым волоскам, а также ингибирует развитие растений. Эти эффекты могут быть связаны не только с действием самих ионов водорода, но и с повышением токсического действия алюминия и марганца, а также со снижением доступности молибдена, кальция, фосфора и кобальта (Munns, 1986; Graham, 1992; Flis et al., 1993; Glenn, Dilworth, 1994). Имеются данные об адаптации к кислотности *Salmonella* и других бактерий (Foster, 1993; Hall et al., 1995), однако далее мы будем обсуждать только эффекты, связанные с действием кислотности почвы на ризобии.

Наиболее чувствительным к кислотности видом ризобий является *S. meliloti*. Многие штаммы *Rhizobium* не могут расти при $\text{pH} < 5.0$ и лишь некоторые штаммы *R. tropici*, *R. loti* и *Bradyrhizobium* выдерживают $\text{pH} < 4.5$ (Keyser, Munns, 1979a, 1979b; Date, Halliday, 1979; Graham et al., 1982, 1994; Brockwell et al., 1991). Эти различия отражаются в численности ризобий в почвах. Так при $\text{pH} = 7$ численность *S. meliloti* в почве равна в среднем $8.9 \cdot 10^4$ клеток на 1 г, тогда как при $\text{pH} = 6$ она составляет лишь 37 клеток на 1 г (Brockwell et al., 1991). Через 2 года после внесения восьми штаммов *R. leguminosarum* bv. *viceae* в почву с $\text{pH} = 4.8-5.7$ лишь три из них смогли поддерживать свою численность на уровне более 100 клеток на 1 г (Carter et al., 1995).

Наиболее интересные данные получены при изучении *R. etli*. Хозяин этих бактерий, *Phaseolus vulgaris*, происходит из горных районов Центральной и Южной Америки, где фасоль была введена в культуру более 7000 лет назад (Kaplan, 1965; Gepts, Debouck, 1991). В этих засушливых районах, где почвы являются нейтральными или щелочными, фасоль взаимодействует в основном с *R. etli* (Pinero et al., 1988; Souza et al., 1994). Значительно позднее фасоль была интродуцирована из Центральной Америки в Карибский регион и Бразилию, а из Южной Америки в Европу и Африку (Gerps, 1988). В кислых почвах Бразилии и Африки выживание кислотоустойчивых бактерий *R. etli* ограничено, в связи с чем они были замещены устойчивым симбионтом *R. tropici*. В двух почвах Кении, содержащих приблизительно 10^4 клеток ризобий фасоли на 1 г, присутствие *R. tropici* коррелировало с кислотностью: при $\text{pH} = 6.8$ к этому виду относился лишь 1 изолят из 40, а при $\text{pH} = 4.5$ — 30 изолятов из 35 (Anyango et al., 1995). В Бразилии 111 из 115 изолятов были способны расти при $\text{pH} = 4.5$, а 116 из 140 изолятов нодулировали *Leucaena leucocephala*, что характерно для *R. tropici* (Vargas, Denardin, 1992). Происхождение *R. tropici* неясно, однако показано, что многие виды *Macroptilium* (один из возможных хозяев) произрастают в этом регионе (Feverieiro, 1987) и штаммы *R. tropici* могут быть выделены из местных хозяев, таких как *Lonchocarpus* и *Gliricidia* (Hungria et al., 1993).

Причины различия штаммов по кислотоустойчивости могут быть связаны с поддержанием pH цитоплазмы (O'Hara et al., 1989; Graham et al., 1994), накоплением совместимых растворов (Aarons, Graham, 1991; Graham et al., 1994), проницаемостью мембран (Chen et al., 1993; Graham et al., 1994), метаболизмом кальция (Howieson et al., 1992; Tiwari et al., 1992; Reeve et al., 1993) и выбросом протонов (Chen et al., 1993). У ризобий выявлены белки кислотного шока (Aarons, Graham, 1991; Bhat, Carlson, 1992) и двухкомпонентная система передачи сигналов, реагирующая на pH у *S. meliloti* (Tiwari et al., 1996).

При низких величинах pH кислотоустойчивые штаммы часто, но не всегда образуют клубеньки лучше, чем чувствительные штаммы (Graham et al., 1982; Howieson, Ewing, 1986). Поэтому хотя при образовании клубеньков у фасоли штаммы *R. etli* в целом более конкурентоспособны, чем *R. tropici* (Martinez, Rosenbleuth, 1991; Chaverra, Graham, 1992), последние обычно доминируют в кислых почвах (Vargas, Graham, 1988; Streit et al., 1992; Frey, Blum, 1994). При взаимодействии с соей, растущей в нейтральных почвах Испании, штаммы *S. fredii* более конкурентоспособны, чем *B. japonicum*, однако последние более конкурентоспособны в кислых почвах с $\text{pH} = 4.9$.

(Buendia-Claviera et al., 1994). Различия в устойчивости растения-хозяина коррелируют с различиями ризобий по устойчивости. Наиболее яркие примеры получены при изучении *Medicago polymorpha* и *M. murex* в Австралии (Ewing et al., 1989; Howieson et al., 1991) и *Glycine max* в почвах церрадо в Бразилии (Spehar, 1994). Отбор сортов *Medicago* и штаммов *Sinorhizobium* на кислотоустойчивость позволил расширить возделывание однолетних кормовых видов люцерны на больших площадях Юго-Восточной Австралии, что привело к повышению урожая зеленой массы и семян на 51% и 31%, соответственно. При этом продуктивность хорошо коррелирует с устойчивостью ризобий и способностью формировать клубеньки в условиях кислой почвы (Howieson et al., 1991). Высокие концентрации кальция необходимы для роста как устойчивых, так и чувствительных к кислотности штаммов *S. meliloti* (O'Hara et al., 1989; Howieson et al., 1992; Reeves et al., 1993; Tiwari et al., 1994), однако причины этого пока неясны.

V.B. ТЕМПЕРАТУРА

Температура почвы влияет на рост и выживание ризобий, их взаимодействие с бобовыми растениями, а также на конкуренцию за образование клубеньков. Хотя многие почвенные микробы могут выживать при относительно низких температурах, их рост и метаболическая активность обычно подавляются при температуре ниже оптимальной (Atlas, Bathra, 1994). Ризобии, обитающие в умеренных широтах, обычно выживают при 4°C, однако при этом практически не растут (Trinick, 1982). В то же время, ризобии, выделенные из арктических районов Канады, нормально растут при 5°C (Prevost et al., 1987). Высокая температура почвы вызывает гибель многих почвенных микробов, в том числе и ризобий. В то же время, при изучении ризобий вигны, выделенных из почв Нигерии, выявлены межштаммовые различия по температуроустойчивости (Eaglesham, Ayana, 1984). Важно отметить, что действие температуры на рост и выживание микробов зависит от других факторов, например от влажности и pH.

Высокие и низкие температуры нарушают и процесс образования клубеньков. Высокая температура корней ингибирует инфекционный процесс, азотфиксацию и рост бобовых растений (Frings, 1976; Munevar, Wollum, 1982; Rainbird et al., 1983; Arayankoon et al., 1990; Kishinevsky, Weaver, 1992; Hungria, Franco, 1993; Michiels et al., 1994). Поскольку микро- и макросимбионты по-разному реагируют на температурный стресс, эффект температуры на симбиоз определяется сорто-штаммовым взаимодействием (La Favre, Eaglesham, 1986; Munevar, Wollum, 1982; Arayankoon et al., 1990). Показано, что охлаждение корневой зоны ограничивает клубенькообразование и азотфиксацию при симбиозе сои с *B. japonicum* и люцерны с *S. meliloti* (Lynch, Smith, 1994; Zhang et al., 1995; Martinez et al., 1995; Rice et al., 1995). Однако во втором случае способность к образованию клубеньков и азотфиксации проявляется при 10–12°C. Ризобии, выделенные из *Astragalus* и *Oxytropis* в арктических районах Канады, способны к эффективной симбиотической азотфиксации при 5°C (Prevost et al., 1987). Штаммы *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, выделенные в Скандинавии, проявляют более высокую симбиотическую активность при 10°C, чем штаммы из южных районов (Ek-Jander, Fahraeus, 1971). К сожалению, выполнено мало аутоэкологических исследований по оценке роста и выживаемости ризобий при разных температурах. Однако показано, что выживаемость *B. japonicum* в нестерильной почве снижается при повышенной температуре (Kennedy, Wollum, 1988). Численность почвенных популяций ризобий на Гавайях коррелирует с температурой почвы (Woomer et al., 1988).

V.C. ВОДНЫЙ РЕЖИМ

Почвенная влага может влиять на рост микроорганизмов посредством процессов диффузии, массового перемещения и изменения концентрации питательных веществ (Paul, Clark, 1989). Хотя влияние влажности и водного стресса на растения изучено хорошо, действие этих факторов на поступление в ризосферу корневых эксудатов и на последующий рост ризосферных микробов неясно (Drew, 1990). Однако известно, что пониженная влажность влияет на рост почвенных микроорганизмов непосредственно или опосредованно, действуя на количество корневых эксудатов, поступающих в ризосферу, рост растений и морфологию корней.

Один из механизмов, ограничивающих образование клубеньков в засушливых условиях, состоит в снижении численности популяций ризобий во время сухого сезона. В ряде работ показаны различия между штаммами (в основном лабораторными) по устойчивости к высыханию, однако данные о механизмах этих различий отсутствуют. Показано, что ризобии клевера могут проявлять высокую устойчивость к высыханию в условиях стерильной почвы (Fuhmann et al., 1986). Например, штамм С16 проявил высокую выживаемость в течение 21 дня при водном потенциале -500 МПа. Производственный штамм ТА1 давал самые малочисленные популяции после 42 дней инкубирования. Попытки провести селекцию штаммов *S. meliloti* на засухоустойчивость неубедительны, так как период инкубации — 14 дней — был слишком коротким (Mary et al., 1985). В некоторых работах показано, что медленнорастущие ризобии более устойчивы к высыханию, чем быстро-растущие (Chatel, Parker, 1973; Bushby, Marshall, 1977; Woome et al., 1988; Mary et al., 1994) однако другие авторы получили противоположные результаты (Pena-Gabiales, Alexander, 1979; Van Rensburg, Strijdom, 1980; Mahler, Wollum, 1981). Результаты этих работ трудно обсуждать, так как обычно изучалось небольшое число штаммов, и выявленные противоречия могут быть связаны с высокой межштаммовой изменчивостью.

V.D. ТРОФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

В обзоре, посвященном роли трофических факторов в экологии ризобий (Brockwell et al., 1995) отмечено разнообразие потребностей этих организмов, особенно в отношении ароматических веществ почвы. *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* обладают путями деградации протокатахата, а *R. leguminosarum* — и способностью к деградации катехола (Chen et al., 1984; Parke, Ornston, 1984). Ризобии сои способны деградировать дейдзенин и гинестенин, получая ароматические соединения (Rao, Cooper, 1995). Деградация ризобиями поли-хлоринированных бифенилов (Damaj, Ahmad, 1996) и мимозина (Soedarjo et al., 1994) подтверждает метаболическое разнообразие этих организмов и может быть связана с их выживанием в почве. Ароматические соединения могут играть важную роль в выживании ризобий, образующих симбиоз с *Acacia albida* (Dupuy et al., 1994) и *Prosopis glandulosa* (Jenkins et al., 1987; Thomas et al., 1994) в глубоких слоях почвы. Данные о метаболизме ароматических соединений ризобиями в почве и ризосфере немногочисленны. Показано, что мутант *R. leguminosarum*, утративший способность к деградации ароматических соединений, сохранил свою конкурентоспособность (Rynne et al., 1994).

У 10-14% штаммов *S. meliloti* и *R. leguminosarum* выявлена способность к синтезу ризопинов в клубеньках бобовых, кодируемая симбиотическими плазмидами (Murphy et al., 1995; Rossbach et al., 1995). У этих же штаммов всегда имеется способность к катаболизму ризопинов в чистой культуре. Способные к синтезу и катаболизму ризопинов штаммы обычно обладают повышенной конкурентоспособностью. Поэтому манипулирование данными генами может быть одним из подходов для конструирования штаммов, которые, обладая повышенной ризосферной конкурентоспособностью, способны защищать растения от почвенных патогенов и токсичных веществ, а также стимулировать их рост (O'Connell et al., 1996).

Гопаноидные липиды составляют до 40% общих липидов *Bradyrhizobium*, однако отсутствуют у *Rhizobium* (Kannenberg et al., 1995). Их роль в биогенезе клеточных мембран, устойчивости бразили-ризобий к стрессам и в их метаболизме привлекает большое внимание. Приведенные данные представляют большой интерес в связи с повышением выживаемости в почве, скорости образования клубеньков и азотфиксирующей активности у штаммов *Bradyrhizobium* в составе гранулированных инокулятов, содержащих глицерол и глутамат натрия.

Внесение в почву сточных вод может снижать численность и разнообразие почвенных популяций ризобий (Giller et al., 1989; Hirsch et al., 1993). Показано, что после 20 лет внесения в почву стоков в ней сохранился единственный неэффективный штамм *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Лучшей выживаемостью в этой почве обладали штаммы *S. meliloti*. При внесении в почву 112 т/га сточных вод наилучшую выживаемость проявили ризобии сои, причем не было выявлено изменения даже в составе серогрупп этих бактерий (Kinkle et al., 1987).

VI. Конкуренция в почве и ризосфере

Результаты изучения конкуренции между штаммами ризобий за образование клубеньков рассмотрены в ряде обзоров (Triplett, Sadowsky, 1992; Streeter, 1994; Toro, 1996). Конкурентоспособность определяют как способность одного или более штаммов проникать в клубеньки специфического бобового хозяина в условиях смешанной инокуляции или в присутствии местной почвенной популяции ризобий. Когда конкурирующие штаммы равномерно распределены в почве, результат конкуренции может быть описан математически (Ireland, Vincent, 1968; Amarger, Lobreau, 1982; Beattie et al., 1989). Однако большинство работ выполнено в условиях искусственного выращивания растений, и неясно, насколько они отражают процессы, происходящие в естественных условиях (Bottomley, 1992). Более того, в большинстве работ изучалась конкуренция между генетически неродственными и серологически различающимися штаммами. Поэтому полученные результаты могут не являться в полной мере экологически значимыми, так как в природе наиболее важна конкуренция между генетически родственными формами.

Неспособность штаммов-инокулянтов формировать значительное число клубеньков в полевых условиях является одним из основных препятствий для повышения эффективности симбиотической азотфиксации. На конкуренцию между штаммами влияют многие абиотические и биотические факторы. Наиболее важными абиотическими факторами являются: ограниченность микробов и растений в источниках питания, а также свойства почвы – влажность, кислотность, температура, структура, содержание органики (Dowling, Broughton, 1986; Bottomley, 1992; Triplett, Sadowsky, 1993; Turko, Sadowsky, 1995). Среди биотических факторов особенно важны: продукция бактериоцинов и антибиотиков (Triplett et al., 1988; Triplett, Sadowsky, 1992), численность и свойства местных микроорганизмов, включая хищных простейших (Danso et al., 1975), скорость образования клубеньков, связанная с авторегуляторными эффектами (McDermott, Graham, 1990), синтез экзополисахаридов (Araujo, Handelsman, 1990; Zdor, Pueppke, 1991; Bhagwat, Keister, 1991), способ применения инокулюма (McDermott, Graham, 1989) и подвижность бактерий (Mellor et al., 1987; Caetano-Anolles et al., 1988; Liu et al., 1989).

Хотя численность бактерий не является единственным фактором конкуренции (Moawad et al., 1984; Bottomley, 1992), инокуляция часто оказывается неэффективной, если численность местных штаммов превышает 10^2 – 10^3 клеток на 1 г почвы (Singleton, Tavares, 1986; Evans et al., 1996). Существенное снижение числа клубеньков, сформированных штаммом-инокулятом, может наблюдаться уже при численности местных штаммов всего в 10 клеток на 1 г почвы (Thies et al., 1991; Sagginga et al., 1996).

Отношение численностей интродуцируемых в почву и местных штаммов может достигать 250:1 (Brockwell et al., 1995). При этом первые часто распределены в почве неравномерно и недостаточно хорошо адаптированы к почвенным условиям (McDermott, Graham, 1989; Bushby, 1993). В результате штамм-инокулят часто формирует всего 5–10% клубеньков в первый год, а затем его численность еще больше снижается. Поэтому проводится большое количество работ, направленных на: (1) селекцию штаммов с высокой конкурентоспособностью (Johnson, Means, 1964; Caldwell, 1969; Berg et al., 1988; Klubek et al., 1988; Smith, Wollum, 1989); (2) использование повышенных доз инокулянта (Kapusta, Rouwenhoest, 1973; Weaver, Frederick, 1974a, 1974b); (3) создание улучшенных носителей и способов внесения инокулянтов (Wilson, 1975; Stoddard, 1976; Boonkerd et al., 1978; Kremer, Peterson, 1983); (4) детальное экологическое изучение местных штаммов-конкурентов, например серогруппы 123 *B. japonicum* (Ellis et al., 1984; Sadowsky et al., 1987b, 1990; Viteri, Schmidt, 1987, 1989; Moawad et al., 1984); (5) изучение молекулярных механизмов конкурентных взаимодействий (раздел VI.A); (6) повторную инокуляцию (Dunigan et al., 1984; McLoughlin et al., 1990; Howieson, 1995); (7) анализ влияния хозяина на конкуренцию и на ограничение клубенькообразования (Cregan et al., 1986; Sadowsky et al., 1987b, 1990; Sadowsky, Cregan, 1992; Ferrey et al., 1994). Важным является изучение микроорганизмов, являющихся стабильными компонентами местной микрофлоры и занимающих доступные экологические ниши в почве. По-видимому, переход штамма в разряд “местных” связан с быстрой и ранней колонизацией, сопровождаемой стабильным поддержанием в почве (Atlas, Bartha, 1993; Turko, Sadowsky, 1995).

Работы некоторых авторов (Kamicker, Brill, 1989; McDermott, Graham, 1989; Wadisirisuk et al., 1989) показали, что штаммы-инокулянты могут хорошо приживаться в области коронки растений, однако из-за недостаточной подвижности не колонизируют растущий корень. При этом инокулят формирует 33–39% клубеньков в верхней части корня, однако не обнаруживается в клубеньках, образованных на боковых корнях на расстоянии 8 см от инокулированной семенной кожуры (McDermott, Graham, 1989). Снижение присутствия штамма в клубеньках по мере удаления от сайта инокуляции показано многими авторами (Salema, Parker, 1982). Поэтому очевидно, что мы должны разделять проблему конкуренции в узком смысле слова и проблему подвижности штаммов в почве и слабого инфицирования инокулянтами боковых корней. Существенным представляется изучение подвижности производственных штаммов и ее вклада в конкурентоспособность. В ряде работ инфекционность штаммов изучалась в связи с подвижностью (Mellor et al., 1987; Catlow et al., 1990a, 1990b; Broek, Vanderleyden, 1995) и хемотаксисом (Caetano-Anolles et al., 1988a, 1988b; Kape et al., 1991; Broek, Vanderleyden, 1995). Хотя эти свойства могут играть важную роль для занятия специфических сайтов на корнях, штаммы-инокулянты вряд ли способны мигрировать на расстояния, достаточные для нодуляции боковых корней. Предполагается (Graham, McDermott, 1990), что основная проблема, стоящая перед штаммом-инокулятом в почве, заключается не в конкуренции, а в достижении корня ранее того момента, когда он утратит способность формировать клубеньки или включатся механизмы авторегуляции (Bhuvaneswari et al., 1981; Pierce, Bauer, 1983; Heron, Puerpke, 1987). Штаммы, которые не могут сформировать клубеньки своевременно, оценивают как неконкурентоспособные. Если это представление является правильным, то следует ожидать тесной корреляции между конкурентоспособностью и скоростью инфекции, определенной на кончиках корней (Bhuvaneswari et al., 1981). Такая связь выявлена в ряде работ (Stephens, Cooper, 1988; McDermott, Graham, 1990; Chaverria, Graham, 1992; Lupwayi et al., 1996), однако она не наблюдается в случае предпочтительности хозяина по отношению к определенным штаммам (Montealegre, Graham, 1996).

VI.A. ГЕНЕТИКА КОНКУРЕНЦИИ ЗА ОБРАЗОВАНИЕ КЛУБЕНЬКОВ

Последние достижения в области молекулярной генетики симбиоза позволили выявить ряд генов, контролирующих конкуренцию ризобий за образование клубеньков. Учитывая, что очень многие бактериальные гены влияют на рост и сапрофитную компетентность бактерий, очевидно, что конкурентоспособность является крайне сложным для генетического анализа признаком. До сих пор не выявлены гены, контролирующие конкурентоспособность как таковую, однако найдено много генов, влияющих на этот признак. Для многих из них механизм действия на конкурентоспособность еще не выяснен, однако в ряде случаев показана связь данных генов с эффективностью клубенькообразования, свойствами клеточной поверхности, синтезом экзополисахаридов, подвижностью, продукцией антибиотиков и симбиотической эффективностью.

VI.A.1. Свойства клеточной поверхности

При нарушениях генов, контролирующих поверхностные компоненты клеток ризобий, часто выявляются изменения конкурентоспособности. Например, бесслизистые мутанты штамма USDA208 *S. fredii* имеют повышенную конкурентоспособность при инокуляции сои *Glycine max*, сорт Пекин (Zdor, Puerpke, 1991). В то же время, Tn5-мутанты *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. tropici* и *B. japonicum*, дефектные по синтезу экзополисахаридов (ЭПС), менее конкурентоспособны, чем исходные штаммы (Araujo, Handelsman, 1990; Bhagwat et al., 1991). У одного из исходных штаммов выявлен локус, соответствующий месту встройки транспозона и способный компенсировать нарушения синтеза ЭПС и конкурентоспособности (Bhagwat, Keister, 1991). У *S. meliloti* получен мутант, дефектный по синтезу липополисахаридов и имеющий сниженную скорость клубенькообразования, формирующий мало клубеньков и обладающий снижением конкурентоспособности (Lagares et al., 1992).

VI.A.2. Подвижность

Хотя подвижность и хемотаксис не связаны с образованием клубеньков, они оказались существенными для конкуренции за клубенькообразование (Ames, Bergman, 1981; Caetano-Anolles et al., 1988b) по крайней мере для тех организмов, которые находятся в одном и том же сайте корня. В ряде случаев снижение подвижности ризобий приводит к нарушению конкурентоспособности. Так, мутанты *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, лишенные подвижности, менее конкурентоспособны, чем штамм дикого типа (Mellor et al., 1987). Tn7-индуцированный неподвижный мутант *B. japonicum* также обладал сниженной конкурентоспособностью, однако этот фенотип может быть связан и с нарушением скорости роста (Liu et al., 1989). У *S. meliloti* с использованием этил-метансульфоната были получены неподвижные мутанты, одни из которых лишены жгутиков, а другие их сохранили. Конкурентоспособность у этих мутантов снижена, хотя скорость роста и образования клубеньков при моноинокуляции не изменена (Ames, Bergman, 1981).

VI.A.3. Антибиоз

Гены, кодирующие факторы антибиоза, могут повышать конкурентоспособность ризобий и проявлять этот эффект при переносе в другой штамм (Triplett, 1988). У конкурентоспособного штамма T24 *R. leguminosarum* bv. *trifolii* выявлен ген *tfx*, кодирующий синтез бактериоцина трифолиотоксина, который определяет способность конкурировать со штаммами, лишенными данного гена. Когда ген *tfx* стабильно интегрировался в геном менее конкурентоспособного штамма TA1, данная способность повышалась (Triplett et al., 1987, 1989; Triplett, 1990). Передача способности к синтезу трифолиотоксина в *R. etli* повышала и его конкурентоспособность (Roberto et al., 1997).

VI.A.4. Эффективность клубенькообразования

Эффективность образования клубеньков на растении-хозяине напрямую связана с конкурентоспособностью ризобий. У *S. meliloti* выявлен генетический локус *nfe* (nodule formation efficiency), участвующий в контроле эффективности образования клубеньков и конкуренции за нодуляцию люцерны (Sanjuan, Olivares, 1989). Мутации в этом локусе приводят к резкому снижению скорости образования клубеньков и конкурентоспособности. Экспрессия *nfe*-генов зависит от регуляторной системы NifA-RpoN (Sanjuan, Olivares, 1989; Soto et al., 1993). У *B. japonicum* выявлен *nfe*-подобный ген *nfeC*, который также влияет на конкурентоспособность (Chun, Stacey, 1994). У этих бактерий мутации в генах *nodVW* снижают скорость образования клубеньков (Gottfert et al., 1990; Gottfert, 1993). У штамма USDA201 *S. fredii* мутация в гене *nodJ* вызывает снижение скорости и эффективности образования клубеньков, а также и конкурентоспособности (Boundy-Mills et al., 1994).

VI.A.5. Симбиотическая эффективность

Мутации в некоторых *nod*-генах влияют на скорость инфекции, нодуляционную конкурентоспособность и развитие клубеньков (Sargent et al., 1987; Hahn, Hennecke, 1988). Например, мутант *S. meliloti*, дефектный по синтезу липополисахаридов, имеет сниженную конкурентоспособность при взаимодействии с люцерной (Lagares et al., 1992). Однако данные о влиянии *nif*- и *fix*-генов на конкурентоспособность противоречивы. В некоторых работах показаны конкурентные преимущества штаммов, активно фиксирующих азот (George, Robert, 1991), а в других работах такого преимущества не выявлено (Franco, Vincent, 1976). У штамма *B. japonicum* получен Tn5-мутант, не способный к симбиотической азотфиксации, однако его способность конкурировать за образование клубеньков на сое не изменена (Hahn, Studer, 1986).

VI.A.6. Неохарактеризованные факторы

В ряде работ получены мутации, влияющие на конкурентоспособность, однако функции измененных наследственных факторов неясны. Так, у *S. fredii* получено 600 случайных Tn5-мутантов, среди которых 4 имели сниженную конкурентоспособность. Анализ различных физиологических признаков не позволил выявить различий между мутантами и исходным штаммом (McLoughlin

et al., 1987). При переносе космид, содержащих фрагменты генома конкурентоспособного штамма KIM5 *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* в неконкурентоспособный штамм СЕЗ выявлены 9 клонов с повышенной конкурентоспособностью. Однако этот фенотип оказался связанным с неидентифицированными изменениями генома, а не с перенесенными генами (Beattie, Handelsman, 1993). Позднее у штамма *R. tropici* была осуществлена случайная амплификация различных геномных локусов и выявлены рекомбинанты, обладающие повышенной конкурентоспособностью (Mavingui et al., 1997).

VI.V. РОЛЬ ПЛАЗМИД В ОПРЕДЕЛЕНИИ КОНКУРЕНТОСПОСОБНОСТИ

В ряде работ у быстрорастущих видов *Rhizobium* гены, участвующие в контроле конкурентоспособности, были локализованы на симбиотической плазмиде (Brewin et al., 1983; Bromfield et al., 1985; Brom et al., 1992; Milner et al., 1992; Soto et al., 1993; Michiels et al., 1995). При изучении симбиоза гороха *Pisum sativum* с Афганистан с *R. leguminosarum* bv. *viciae* показано, что не образующие клубеньков штаммы часто блокируют образование клубеньков совместимыми штаммами, и таким образом конкурентоспособность может быть не связана с образованием клубеньков. Последующие работы показали, что для блокировки образования клубеньков наиболее важен ранний период взаимодействия (до 24 часов) (Winarno, Lie, 1979). Гены, контролирующие этот эффект, локализованы на симбиотической плазмиде (Dowling, Broughton, 1987; Dowling et al., 1989).

У клубеньковых бактерий фасоли получены мутанты, излеченные от одной из резидентных плазмид, что позволило оценить вклад каждой из них в определение симбиотических свойств (Brom et al., 1992). Снижение конкурентоспособности выявлено при утрате 4 из 6 имеющихся плазмид. Таким образом, в определении высокого уровня конкурентоспособности могут играть роль не только Sym-плазмиды. У *S. fredii* был получен мутант, лишенный Sym-плазмиды и сохранивший способность формировать клубеньки и фиксировать азот (Mathis et al., 1985). Этот мутант обладал замедленным клубенькообразованием и сниженной конкурентоспособностью.

Изменения конкурентоспособности у ризобий можно наблюдать и при переносе Sym-плазмид. Штаммы *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, содержащие рекомбинантные Sym-плазмиды, имели повышенную симбиотическую эффективность, которая может оказывать не прямое воздействие на конкурентоспособность (Dejong et al., 1981, 1982). В аналогичной работе 4 различные Sym-плазмиды переносили в штаммы *R. leguminosarum*, лишенные этих плазмид. Во всех случаях наблюдали изменение скорости образования клубеньков, но не скорости колонизации ризосферы (Brewin et al., 1983). В одной из работ криптолическая плаزمиды *S. meliloti*, будучи перенесенной в *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, повышала его конкурентоспособность. Все эти данные свидетельствуют о важной роли плазмид в контроле конкурентоспособности *Rhizobium*.

VII. Литература

- Aarons S.R., Graham P.H. (1991) Plant and Soil. V. 134, p. 145-151.
Abel G.H., Erdman L.W. (1964) Agron. J. V. 56, p. 423-424.
Amarger N., Bours M., Revoxy F., Allard M.R., Laguerre G. (1994) Plant and Soil. V. 161, p. 147-156.
Amarger N., Lobreau J.P. (1982) Appl. Environ. Microbiol. V. 44, p. 583-588.
Ames P., Bergman K. (1981) J. Bacteriol. V. 148, p. 728-729.
Anyango B., Wilson K.J., Beynon J.L., Giller K.E. (1995) Appl. Environ. Microbiol. V. 61, p. 4016-4021.
Araujo R.S., Handelsman J. (1990) In: P.M. Greshoff et al. (eds.). Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives, Chapman and Hall, NY.
Arayankoon T., Schomberg H.H., Weaver R.W. (1990) Plant and Soil. V. 126, p. 209-213.
Atlas R.M., Bartha R. (1993) Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. The Benjamin/Cummings Publ. Comp. Redwood City, California.
Beattie G.A., Clayton M.K., Handelsman J. (1989) Appl. Environ. Microbiol. V. 55, p. 2755-2761.
Beattie G.A., Handelsman J. (1993) J. Gen. Microbiol. V. 139, p. 529-538.
Berg R.K., Loynachan T.E., Zablutowicz R.M., Liebermann M.T. (1988) Agron. J. V. 80, p. 876-891.
Bhagwat A.A., Keister D.L. (1991) Appl. Environ. Microbiol. V. 57, p. 3496-3501.
Bhat U.M., Carlson R.W. (1992) J. Bacteriol. V. 174, p. 2230-2235.
Bhuvaneswari T.V., Bhagwat A.A., Bauer W.D. (1981) Plant Physiol. V. 68, p. 1144-1149.
Boonkerd N., Weber D.F., Bezdicek D.F. (1978) Agron. J. V. 70, p. 547-549.

- Bordelcau L., Prevost D. (1994) *Plant and Soil*. V. 161, p. 115-125.
- Bottomley P.J. (1992) In: G. Stacey et al. (eds.) *Chapman and Hall*, NY p. 293-348.
- Bottomley P.J., Cheng H.H., Strain S.R. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 60, p. 1754-1761.
- Boundy-Mills K.L., Kossalak R.M., Tully R.E., Pueppke S.G., Lohrke S.M., Sadowsky M.J. (1994) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 305-308.
- Brewin N.J., Wood E.A., Young J.P.W. (1983) *J. Gen. Microbiol.* V. 129, p. 2973-2977.
- Brockwell J., Bottomley P.J. (1995) *Soil Biol. Biochem.* V. 27, p. 683-697.
- Brockwell J., Bottomley P.J., Thies J.E. (1995) *Plant and Soil*. V. 174, p. 143-180.
- Brockwell J., Dudman W.F. (1968) *Austral. J. Agric. Res.* V. 19, p. 749-757.
- Brockwell J., Gault R.R., Zorin M., Roberts M.J. (1982) *Austral. J. Agric. Res.* V. 33, p. 803-815.
- Brockwell J., Pilka A., Holliday R.A. (1991) *Austral. J. Exp. Agric.* V. 31, p. 211-219.
- Broek A.V., Vanderleyden J. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 800-810.
- Brom S., Garcia de los Santos A., Stepkowsky T., Flores M., Davila G., Romero D., Palacios R. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 5183-5189.
- Bromfield E.S.P., Barran L.R., Wheatecroft R. (1995) *Mol. Ecol.* V. 4, p. 183-188.
- Bromfield E.S.P., Lewis D.M., Barran L.R. (1985) *J. Bacteriol.* V. 164, p. 410-413.
- Brown A.D. (1990) *Microbial Water Stress Physiol.* John Wiley and Sons, West Sussex, England, p. 313.
- Brunel B., Cleyet-Marel J.-C., Normand P., Bardin R. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 54, p. 2636-2242.
- Brunel B., Rome S., Ziani R., Cleyet-Marel J.-C. (1996) *FEMS Microbiol. Ecol.* V. 19, p. 71-82.
- Buendia-Claveria A.M., Rodriguez Navarro D.N., Santamaria Linaza C., Ruiz Sainz J.E., Tempranovera F. (1994) *Syst. Appl. Bacteriol.* V. 17, p. 155-160.
- Burr T.J., Katz B.H., Bishop A.L. (1987) *Plant Disease*. V. 71, p. 617-620.
- Burr T.J., Reid C.L., Yoshimura M., Momol E.A., Bazzi C. (1995) *Plant Disease*. V. 79, p. 677-682.
- Bushby H.V.A. (1990) *Soil Biol. Biochem.* V. 22, p. 1-9.
- Bushby H.V.A. (1993) *Soil Biol. Biochem.* V. 25, p. 597-605.
- Bushby H.V.A., Marshall K.C. (1977) *J. Gen. Microbiol.* V. 99, p. 19-27.
- Cactano-Anolles G., Crist-Estes D.K., Bauer W.D. (1988a) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 3164-3169.
- Cactano-Anolles G., Wall L.G., Micheli A.T., Macchi E.M., Bauer W.D., Favelukes G. (1988b) *Plant Physiol.* V. 86, p. 1228-1235.
- Caldwell B.E. (1969) *Agron. J.* V. 61, p. 813-815.
- Carter J.M., Tieman J.S., Gibson A.H. (1995) *Soil Biol. Biochem.* V. 27, p. 617-623.
- Catlow H.Y., Glenn A.R., Dilworth M.J. (1990a) *Soil Biol. Biochem.* V. 22, p. 331-336.
- Catlow H.Y., Glenn A.R., Dilworth M.J. (1990b) *Soil Biol. Biochem.* V. 22, p. 573-575.
- Chandra R., Parker R.P. (1985) *Trop. Agric.* V. 62, p. 90-94.
- Chatel D.L., Greenwood R.M., Parker C.A. (1968) *Proc. 9th Int. Con. Soil Science, Adelaide*. V. 2, p. 65-73.
- Chatel D.L., Parker C.A. (1973) *Soil Biol. Biochem.* V. 5, p. 415-423.
- Chaverra M.H., Graham P.H. (1992) *Crop Sci.* V. 32, p. 1432-1436.
- Chen Y.P., Glenn A.R., Dilworth M.J. (1984) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 21, p. 201-205.
- Chen H., Richardson A.E., Rolf B.G. (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 59, p. 1798-1804.
- Chun J.Y., Stacey G. (1994) *Mol. Plant-Microbe Inter.* V. 7, p. 248-255.
- Christou P. (1997) *Field Crop Res.* V. 53, p. 83-97.
- Ciarfardini G., Lombardo G.M. (1991) *Agron. J.* V. 83, p. 622-625.
- Corman A., Crozat Y., Cleyet-Marel J.-C. (1987) *Biol. Fertil. Soils*. V. 4, p. 79-84.
- Cregan P.B., Keyser H.H. (1986) *Crop Sci.* V. 26, p. 911-916.
- Crozat Y., Cleyet-Marel J.-C., Corman A. (1987) *Biol. Fertil. Soils*. V. 4, p. 85-90.
- Crozat Y., Cleyet-Marel J.-C., Giraud J.J., Obaton M. (1982) *Soil Biol. Biochem.* V. 14, p. 401-405.
- Damaj M., Ahmad D. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* V. 218, p. 908-915.
- Danso S.K.A., Keya S.O., Alexander M. (1975) *J. Microbiol.* V. 21, p. 884-895.
- Date R.A. (1991) *Soil Biol. Biochem.* V. 23, p. 533-541.
- Date R.A., Halliday J. (1979) *Nature*. V. 277, p. 62-64.
- Davis E.G., Evans I.J., Johnston A.W.B. (1988) *Mol. Gen. Genet.* V. 212, p. 531-535.
- De Bruijn F.J. (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 58, p. 2180-2187.
- Dejong T.M., Brewin N.J., Phillips D.A. (1981) *J. Gen. Microbiol.* V. 127, p. 124-127.
- Dejong T.M., Brewin N.J., Johnston A.W.B., Phillips D.A. (1982) *J. Gen. Microbiol.* V. 128, p. 1829-1838.
- Demezas D.H., Reardon T.B., Strain S.R., Watson J.M., Gibson A.H. (1995) *Mol. Ecol.* V. 4, p. 209-222.
- Demezas D.H., Reardon T.B., Watson J.M., Gibson A.H. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 57, p. 3489-3495.
- Devine T., Kuykendall L.D., O'Neill J.J. (1990) *Theor. Appl. Genet.* V. 80, p. 33-37.
- Diatloff A. (1977) *Soil Biol. Biochem.* V. 9, p. 85-88.
- Dowling D.N., Broughton W.J. (1986) *Annu. Rev. Microbiol.* V. 40, p. 131-157.
- Dowling D.N., Samrey U., Stanley J., Broughton W.J. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 1345-1348.
- Dowling D.N., Stanley J., Broughton W.J. (1989) *Mol. Gen. Genet.* V. 216, p. 170-174.
- Drew M.C. (1990) In: J. Lynch (ed.) *The Rhizosphere*. John Wiley and Sons, West Sussex, England, p. 35-58.
- Dunigan E.P., Bollich P.K., Hutchinson R.L., Hicks P.M., Zaunbrecher F.C., Scott S.G., Mowers R.P. (1984) *Agron. J.* V. 76, p. 463-466.

- Dupuy N., Willems A., Pot B., Dewettinck D., Vandenbruaene I., Maestrojuan G., Dreyfus B., Kersters K., Collins M.D., Gillis M. (1994). *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 44, p. 461-473.
- Dye M., Skot L., Mytton L.R., Harrison S.P., Dooley J.J., Cresswell A. (1995) *Can. J. Microbiol.* V. 41, p. 336-344.
- Eaglesham A.R.J., Ayanaba A. (1984) *Curr. Devel. Biol. Nitrog. Fixat.* N.S. Subba Rao (ed.) Edward Arnold, London, p. 1-35.
- Eardly B.D., Materon L.A., Smith N.H., Johnson D.A., Rumbaugh M.D., Selander R.K. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 56, p. 187-194.
- Ek-Jander J., Fahracus G. (1971) *Plant and Soil*, spec. vol., p. 129-137.
- Ellis W.R., Ham G.E., Schmidt E.L. (1984) *Agron. J.* V. 76, p. 573-576.
- Evans J., Gregory A., Dobrowolski N., Morris S.G., O'Connor G.E., Wallace C. (1996) *Soil Biol. Biochem.* V. 28, p. 247-255.
- Ewing M.A., Pannell D.J., Morrison D.A. (1989). Pastures and profit in the Australian ley farming system, *Proc. XVI Intern. Grassl. Conf. (Nice)*, p. 1349-1350.
- Ferrey M.L., Graham P.H., Russelle M.P. (1994). *Can. J. Microbiol.* V. 40, p. 456-460.
- Feverciro V.P.B. (1987) *Macropitium* (Benth). *Urban do Brasil. (Leguminosae-Faboideae-Phascolae-Phascolinac)*, Arqu, Jardin Rio de Janiero V. 28, p. 109-180.
- Flis S.E., Glenn A.R., Dilworth M.J. (1993) *Soil Biol. Biochem.* V. 25, p. 403-417.
- Fobert P.R., Roy N., Nash J.H., Iyer V.N. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 57, p. 1590-1594.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (1991) Expert consultation on legume inoculant production and quality control, FAO, Rome. P. 145.
- Foster J.W. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 1981-1987.
- Fouilleux G., Revellin C., Hartmann A., Catroux G. (1996) *FEMS Microbiol. Ecol.* V. 20, p. 173-183.
- Franco A.A., Vincent J.M. (1976) *Plant and Soil.* V. 45, p. 27-48.
- Frey S.D., Blum L.K. (1994) *Plant and Soil.* V. 163, p. 157-164.
- Fuhrmann F., Davey C.B., Wollum A.G. (1986) *Soil Sci. Soc. Amer. J.* V. 50, p. 639-644.
- Gault R.R., Bernardi A.L., Thompson J.A., Andrews J.A., Banks L.W., Hebb D.M., Brockwell J. (1994) *Austral. J. Exp. Agric.* V. 34, p. 401-409.
- Gault R.R., Schwingamer E.A. (1993) *Soil Biol. Biochem.* V. 25, p. 1161-1166.
- George M.L.C., Robert F. (1991) *Planta.* V. 180, p. 303-311.
- Gepts P. (1988) In: P. Gepts (ed.) *Genetic resources of Phaseolus beans*, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, p. 375-390.
- Gepts P., Debouck D. (1991) In: A. van Schoonhoven, O. Voysest (eds.). *Common Beans, Research for Crop Improvement*. CIAT, Cali, Colombia, p. 7-53.
- Gibson A.H. (1968) *Austral. J. Agric. Res.* V. 19, p. 907-918.
- Gibson A.H., Brockwell J. (1968) *Austral. J. Agric. Res.* V. 19, p. 891-905.
- Gibson A.H., Curnow B.C., Bergersen F.J., Brockwell J., Robinson A.C. (1975) *Soil Biol. Biochem.* V. 7, p. 95-102.
- Gibson A.H., Date R.A., Ireland J.A., Brockwell J. (1976) *Soil Biol. Biochem.* V. 8, p. 395-401.
- Giller K.E., McGrath S.P., Hirsch P.R. (1989) *Soil Biol. Biochem.* V. 21, p. 841-848.
- Giller K.E., Nussbaum R., Chaudri A.M., McGrath S.P. (1993) *Soil Biol. Biochem.* V. 25, p. 273-278.
- Glenn A.R., Dilworth M.J. (1994) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 123, p. 1-10.
- Gottfert M., Grob P., Hennecke P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 87, p. 2680-2684.
- Gottfert M. (1993) *FEMS Microbiol. Rev.* V. 104, p. 39-64.
- Gordon D.M., Wexler M., Reardon T.B., Murphy P.J. (1995) *Soil Biol. Biochem.* V. 27, p. 491-499.
- Graham P.H. (1985) *Proc. III World Soybean Conf. (Ames)*. R. Shibles (ed.), p. 951-959.
- Graham P.H. (1992) *Can. J. Microbiol.* V. 38, p. 475-484.
- Graham P.H., Dracger K.J., Ferrey M.L., Conroy M.J., Hammer B.E., Martinez E., Aarons S.R., Quinto C. (1994) *Can. J. Microbiol.* V. 40, p. 198-207.
- Graham P.H., McDermott T.R. (1990) The physiology, biochemistry, nutrition, and bioengineering of soybeans, implications for future management. *FAR, St.-Louis*, p. 1-18.
- Graham P.H., Sadowsky M.J., Keyser H.H., Barnett Y.M., Bradley R.S., Cooper J.E., De Ley D.J., Jarvis B.D.W., Roslycky E.B., Strijdom B.W., Young J.P.W. (1991) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 41, p. 582-587.
- Graham P.H., Viteri S.E., Mackie F., Vargas A.A.T., Palacios A. (1982) *Field Crops Res.* V. 5, p. 121-128.
- Guar Y.D., Lowther W.L. (1980) *J. Agric. Res.* V. 23, p. 529-532.
- Hagen M.J., Hamrick J.L. (1996) *Mol. Ecol.* V. 5, p. 177-186.
- Hahn M., Hennecke H. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 54, p. 55-61.
- Hahn M., Studer D. (1986) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 33, p. 143-148.
- Hall H.K., Karem K.L., Foster J.W. (1995) *Adv. Microbiol. Physiol.* V. 37, p. 229-272.
- Ham G.E. (1978) In: *Adv. Legume Sci.* R.J. Summerfield, A.H. Bunting (eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, p. 289-296.
- Hardarson G., Heichel G., Barnes D., Vance C.P. (1982) *Crop Sci.* V. 22, p. 55-58.
- Hardarson G., Heichel G., Vance C.P., Barnes D. (1981) *Crop Sci.* V. 21, p. 562-567.
- Hardarson G., Jones D. (1979a) *Ann. Appl. Biol.* V. 92, p. 229-236.
- Hardarson G., Jones D. (1979b) *Ann. Appl. Biol.* V. 92, p. 329-333.
- Haas J.H., Moore L.W., Ream W., Manulis S. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 61, p. 2879-2884.
- Heron D.S., Ersek T., Krishan H.B., Pueppke S.G. (1989) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 2, p. 4-10.
- Heron D.S., Pueppke S.G. (1987) *Plant Physiol.* V. 84, p. 1391-1396.

- Hirsch P.R. (1996) *New Phytol.* V. 133, p. 159-171.
- Hirsch P.R., Jones M.J., McGrath S.P., Giller K.E. (1993) *Soil Biol. Biochem.* V. 25, p. 1485-1490.
- Holl F.B. (1975) *Euphytica.* V. 24, p. 767-770.
- Howieson J.G. (1995) *Soil Biol. Biochem.* V. 27, p. 603-610.
- Howieson J.G., Ewing M.A. (1986) *Austral. J. Agric. Res.* V. 37, p. 55-64.
- Howieson J.G., Ewing M.A., Thom C.W., Revell C.K. (1991) In: R.J. Wright et al. (eds.) *Plant-Soil Interactions at Low pH*. Kluwer Acad. Publ. The Netherlands, p. 589-595.
- Howieson J.G., Robson A.D., Abbott L.K. (1992) *Austral. J. Agric. Res.* V. 43, p. 765-772.
- Hooykaas P.J.J., Schilperoort R.A. (1992) *Plant Mol. Biol.* V. 19, p. 15-38.
- Hungria M., Franco A.A. (1993) *Plant and Soil.* V. 149, p. 95-102.
- Hungria M., Franco A.A., Sprent J.I. (1993) *Plant and Soil.* V. 149, p. 103-109.
- Ireland J.A., Vincent J.M. (1968) *Trans. 9-th. Int. Conf. Soil Sci.* Adelaide V. 2, p. 85-93.
- Jarvis B.D.W., van Berkum P., Chen W.X., Nour S.M., Fernandez M.P., Cleyet-Mavel J.C., Gilles M. (1997) *Intern. J. Syst. Bacteriol.* V. 47, p. 895-898.
- Jarvis B.D.W., Ward L.J.H., Slade E.A. (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 55, p. 1426-1434.
- Jenkins M.B., Virginia R.A., Jarrell W.M. (1987) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 53, p. 36-40.
- Johnson H.W., Means U.M. (1964) *Agron. J.* V. 56, p. 60-62.
- Jones D.G., Hardarson G. (1979) *Ann. Appl. Biol.* V. 92, p. 221-228.
- Judd A.K., Schneider M., Sadowsky M.J., de Bruijn F.J. (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 59, p. 1702-1708.
- Kado C.I. (1991) *Crit. Rev. Plant Sci.* V. 10, p. 1-32.
- Kamicker B.J., Brill W.J. (1987) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 53, p. 1737-1742.
- Kannenberg E.L., Perzl M., Hartner T. (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 127, p. 255-262.
- Kape R., Parniske M., Werner D. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 57, p. 316-319.
- Kaplan L. (1965) *Econ. Bot.* V. 19, p. 358-368.
- Kapusta D., Rouwenhoest D.L. (1973) *Agron. J.* V. 65, p. 916-919.
- Kcatinge J.D.H., Beck D.P., Materon L.A., Yurtsever N., Karuc K., Altuntas S. (1995) *Experim. Agric.* V. 31, p. 501-507.
- Kennedy A.C., Wollum A.G. (1988) *Soil Biol. Biochem.* V. 20, p. 933-937.
- Kerstens K., De Ley J. (1984) *Genus III, Agrobacterium*. In: N.R. Krieg, J.G. Hol (eds.), *Bergey's Manual of Sytematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 244-254.
- Keyser H.H., Munns D.N. (1979a) *Soil Sci. Soc. Amer. J.* V. 43, p. 500-503.
- Keyser H.H., Munns D.N. (1979b) *Soil Sci. Soc. Amer. J.* V. 43, p. 519-523.
- Kinkle B.K., Angle J.S., Keyser H.H. (1987) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 53, p. 315-319.
- Kinkle B.K., Schmidt E.L. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 57, p. 3264-3269.
- Kipe-Nolt J.A., Monteclegre M., Thome J. (1992) *New Phytol.* V. 120, p. 489-494.
- Kishinevsky B.D., Sen D., Weaver R.W. (1992) *Plant and Soil.* V. 143, p. 275-282.
- Klubek B.P., Hendrickson L.L., Zablotowicz R.M., Skwara J.E., Varsa E.C., Smith S., Isleib T.G., Maya J., Valdes M., Dazzo F.B., Todd R.L., Walgenback D.D. (1988) *Soil Sci. Soc. Amer. J.* V. 52, p. 662-666.
- Kremer R.J., Peterson H.L. (1983) *Agron. J.* V. 75, p. 139-143.
- Krishnan H.B., Pueppke S.G. (1991) *Mol. Microbiol.* V. 5, p. 737-745.
- Kucey R.M.N., Hynes M.F. (1989) *Can. J. Microbiol.* V. 35, p. 661-667.
- Kumar Rao J.V.D.K., Dart P.J., Usha Khan M. (1982) In: P.H. Graham, S.C. Harris (eds). *BNF Technol. Trop. Agric.* CIAT, Cali Colombia, p. 291-295.
- Labes G., Ulrich A., Lentsch P. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 62, p. 1717-1722.
- La Favre A.K., Eaglesham A.R.J. (1986) *Can. J. Microbiol.* V. 32, p. 22-27.
- Lagares A., Cactano-Annoles G., Niehaus K., Lorenzen J., Lunggren H.D., Puhler A., Favelukes G. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 5841-5952.
- Lange R.T., Parker C.A. (1960a) *Plant and Soil.* V. 13, p. 137-146.
- Lange R.T., Parker C.A. (1960b) *Nature.* V. 186, p. 178-179.
- Leung K., Strain S.R., de Bruijn F.J., Bottomley P.J. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 60, p. 416-426.
- Lewis-Henderson W.R., Djordjevic M.A. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 2791-2799.
- Lie T.A. (1978) *Ann. Appl. Biol.* V. 88, p. 462-465.
- Lie T.A. (1984) *Plant and Soil.* V. 82, p. 415-425.
- Lie T.A., Goktan D., Pijnborg J., Anlarsal E. (1987) *Plant and Soil.* V. 100, p. 171-181.
- Lieven-Antoniou C.A., Whittam T.S. (1997) *Mol. Ecol.* V. 6, p. 629-639.
- Lindstrom K., Lipsanen P., Kaijalainen S. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 56, p. 444-450.
- Liu R., Tran V.M., Schmidt E.L. (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 55, p. 1895-1900.
- Lohrke S.M., Orf J.H., Sadowsky M.J. (1995) *Abstr. 15-th North Amer. Symb. Nitrog. Fixat. Conf.* Raleigh, North Carolina.
- Lohrke S.M., Orf J.H., Sadowsky M.J. (1996) *Crop Sci.* V. 36, p. 1271-1276.
- Lupwayi N.Z., Stephens P.M., Noonan M.J. (1996) *Symbiosis.* V. 21, p. 233-248.
- Lynch D.H., Smith D.L. (1994) *Physiol. Plantarum.* V. 90, p. 105-113.
- Ma S.-W., Iyer V.N. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 56, p. 2206-2212.
- Madrzak C.J., Golinska B., Kroliczak J., Pudelfo K., Lazewska D., Lampa B., Sadowsky M.J. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 61, p. 1194-1200.
- Mahler R.L., Wollum A.G. (1981) *Soil Sci. Soc. Amer. J.* V. 45, p. 761-766.

- Marshall K.C., Mulcahy M.J., Chowhury M.S. (1963) *J. Austral. Inst. Agric. Sci.* V. 29, p. 160-164.
- Martinez E., Palacios R., Sanchez F. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 2828-2834.
- Martinez-Romero E., Rosenblueth M. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 56, p. 2384-2388.
- Mary P., Dupuy N., Dolhembiremon C., Delfives C., Tailliez R. (1994) *Soil Biol. Biochem.* V. 26, p. 1125-1132.
- Mary P., Ochin D., Tailliez R. (1985) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 50, p. 207-211.
- Materon L.A. (1994) *Appl. Soil. Ecology.* V. 1, p. 255-260.
- Mathis J.N., Barbour W.M., Elkan G.H. (1985) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 49, p. 1385-1388.
- Mavingui P., Flores M., Romero D., Martinez-Romero E., Palacios R. (1997) *Nature Biotechnol.* V. 15, p. 564-569.
- McDermott T.R., Graham P.H. (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 55, p. 2493-2498.
- McDermott T.R., Graham P.H. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 56, p. 3035-3039.
- McDermott T.R., Graham P.H., Brandwein D.H. (1987) *Arch. Microbiol.* V. 148, p. 100-106.
- McLoughlin T.J., Alt S.G., Merlo P.A. (1990) *Can. J. Microbiol.* V. 36, p. 794-800.
- McLoughlin T.J., Merlo A.O., Satola S.W., Johansen E. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 410-413.
- Meinhardt L.W., Krishnan H.B., Balatti P.A., Pueppke S.G. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 9, p. 17-27.
- Mellor H.Y., Glenn A.R., Dilworth M.J. (1987) *Arch. Microbiol.* V. 148, p. 34-39.
- Michiels J., Verreth C., Vanderleyden J. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 60, p. 1206-1212.
- Milner J.L., Araujo R.S., Handelsman J. (1992) *Mol. Microbiol.* V. 6, p. 3137-3147.
- Moawad H.A., Ellis W.R., Schmidt E.L. (1984) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 47, p. 607-612.
- Montanez A., Danso S.K.A., Hardarson G. (1995) *Appl. Soil Ecol.* V. 2, p. 165-174.
- Montealegre C., Graham P.H. (1996) *Can. J. Microbiol.* (In press).
- Montealegre C., Graham P.H., Kipe-Nolt J.A. (1995) *Can. J. Microbiol.* V. 41, p. 992-998.
- Montealegre C., Kipe-Nolt J.A. (1994) *Arch. Microbiol.* V. 162, p. 352-356.
- Munevar F., Wollum A.G. (1982) *Agron. J.* V. 74, p. 138-142.
- Munns D.N. (1986) *Adv. Plant Nutr.* V. 2, p. 63-91.
- Murphy P.J., Wexler W., Grzemeski W., Rao J.P., Gordon D. (1995) *Soil Biol. Biochem.* V. 27, p. 525-529.
- Nangju D. (1980) *Agron. J.* V. 72, p. 403-406.
- Nour S.M., Cleyet-Marel J.-C., Normand P., Fernandez M.P. (1995) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 45, p. 640-648.
- O'Connell K.P., Goodman R.M., Handelsman J. (1996) *Trends Biotechnol.* V. 14, p. 883-888.
- O'Hara G.W., Goss T.J., Dilworth M.J., Glenn A.R. (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 55, p. 1870-1876.
- Paffetti D., Scotti C., Gnocchi S., Fancelli S., Bazzicalupo M. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 62, p. 227-2285.
- Parke D., Ornston L.N. (1984) *J. Gen. Microbiol.* V. 130, p. 1743-1750.
- Parke D., Ornston L.N. (1986) *J. Bacteriol.* V. 165, p. 288-292.
- Parker M.A. (1995) *Ecology.* V. 76, p. 1525-1535.
- Paul E.A., Clark F.E. (1989) *Soil Microbiol. Biochem. Acad. Press, San Diego, CA*, p. 271.
- Pena-Cabrieles J.J., Alexander M. (1979) *Soil Sci. Soc. Am. J.* V. 43, p. 962-966.
- Picard C., Ponsonnet C., Paget E., Nesme X., Simonet P. (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 58, p. 2717-2722.
- Pierce M., Bauer W.D. (1983) *Plant Physiol.* V. 73, p. 286-290.
- Pifero D., Martinez E., Selander R.K. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 54, p. 2825-2832.
- Prevost D., Bordeleau L.M., Caudry-Reznick S., Schulman H.M., Antoun H. (1987) *Plant and Soil.* V. 98, p. 313-324.
- Pulver E.L., Brockman F., Wien H.C. (1982) *Crop Sci.* V. 22, p. 1065-1070.
- Rainbird R.M., Atkins C.A., Pate J.S. (1983) *Plant Physiol.* V. 73, p. 392-394.
- Rao J.R., Cooper J.E. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 855-862.
- Reeve W.G., Tiwari R.P., Dilworth M.J., Glenn A.R. (1993) *Soil Biol. Biochem.* V. 25, p. 581-586.
- Rice W.A., Olsen P.E., Collins M.M. (1995) *Plant and Soil.* V. 170, p. 351-358.
- Richardson A.E., Viccars L.A., Watson J.M., Gibson A.H. (1995) *Soil Biol. Biochem.* V. 27, p. 515-524.
- Roberto E.A., Scupham A.J., Triplett E.W. (1997) *Molec. Plant-Microbe Interact.* V. 10, p. 228-233.
- Roberts G.P., Leps W.T., Silver L.E., Brill W.J. (1980) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 39, p. 414-422.
- Rome S., Brunel B., Normand P., Fernandez M., Cleyet-Marel J.P. (1996) *Arch. Microbiol.* V. 165, p. 285-288.
- Rosbach S., Rasul G., Schneider M., Eardly B., de Bruijn F.J. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 549-559.
- Roughley R.J., Gault R.R., Gemell L.G., Andrews J.A., Brockwell J., Thompson J.A. (1995) *Plant and Soil.* V. 176, p. 1-14.
- Roughley R.J., Gemell L.G., Thompson J.A., Brockwell J. (1993) *Soil. Biol. Biochem.* V. 25, p. 1453-1458.
- Rynne F.G., Glenn A.R., Dilworth M.J. (1994) *Soil Biol. Biochem.* V. 26, p. 703-710.
- Sadowsky M.J., Bohloul B.B., Keyser H.H. (1987a) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 53, p. 1785-1789.
- Sadowsky M.J., Cregan P.B. (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 58, p. 720-723.
- Sadowsky M.J., Cregan P.B., Keyser H.H. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 56, p. 1468-1474.
- Sadowsky M.J., Hur H.-G. (1996) In: J.R. Lupski et al. (eds.), *Bacterial Genomes: Structure and Analysis*. Chapman and Hall, in press.
- Sadowsky M.J., Olson E.R., Foster V.E., Kossak R.M., Verma D.P.S. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 171-178.
- Sadowsky M.J., Tully R.E., Cregan P.B., Keyser H.H. (1987b) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 53, p. 2624-2630.
- Salama M.P., Parker C.A., Kidby D.K., Chatel D.L. (1982) In: BNF Techn. Trop. Agric. P.H. Graham, S.C. Harris (eds). CIAT, Cali, Colombia, p. 213-217.
- Sanginga N., Abaidoo R., Dashiell K., Carsky R.J., Okogun A. (1996) *Appl. Soil. Ecol.* V. 3, p. 215-224.
- Sanginga N., Danso S.K.A., Mulongoy K., Ojeifo A.A. (1994) *Plant and Soil.* V. 159, p. 199-204.
- Sanjuan J., Olivares J. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 4154-4161.

- Sanjuan J., Olivares J. (1991) Arch. Microbiol. V. 155, p. 543-548.
- Sargent L., Huang S.Z., Rolfe B.G., Djordjevic M.A. (1987) Appl. Environ. Microbiol. V. 53, p. 1611-1619.
- Sawada H., Ieki H., Matsuda I. (1995) Appl. Environ. Microbiol. V. 61, p. 828-831.
- Schortemeyer M., Hartwig U.A., Hendrey G.R., Sadowsky M.J. (1996) Soil Biol. Biochem. V. 28, p. 1717-1724.
- Schroth M.N., Weinbold A.R., McCain A.H., Hildebrand D.C., Ross N. (1971) Hilgardia. V. 40, p. 537-552.
- Segovia L., Pinero D., Palacios R., Martinez-Romero E. (1991) Appl. Environ. Microbiol. V. 57, p. 426-433.
- Singleton P.W., Tavares J.W. (1986) Appl. Environ. Microbiol. V. 51, p. 1013-1018.
- Slattery J.F., Coventry D.R. (1993) Soil Biol. Biochem. V. 25, p. 1725-1730.
- Smith G.B., Wollum A.M. (1989) Appl. Environ. Microbiol. V. 55, p. 1957-1962.
- Smith R.S. (1992) Can. J. Microbiol. V. 38, p. 485-492.
- Smith R.S., del Rio Ecurra G.A. (1982) J. Agric. Univ. P.R. V. 66, p. 241-249.
- Smith R.S., Ellis M.A., Smith R.E. (1981) Agron. J. V. 73, p. 505-508.
- Soberon-Chavez G., Najera R. (1989) Can. J. Microbiol. V. 35, p. 464-468.
- Soedarjo M., Hemscheidt T.K., Borthakur D. (1994) Appl. Environ. Microbiol. V. 60, p. 4268-4272.
- Somasegaran P., Hoben H.J. (1994) Handbook for Rhizobia. Springer, NY, p. 450.
- Soto M.J., Zorano A., Mercado-Blanco J., Lepek V., Olivares J., Toro N. (1993) J. Mol. Biol. V. 229, p. 570-576.
- Souza V., Eguarte L., Avila G., Cappello R., Gallardo C., Montoya J., Pinero D. (1994) Appl. Environ. Microbiol. V. 60, p. 1260-1268.
- Spchar C.R. (1994) Field Crops Res. V. 41, p. 141-146.
- Spoerke J.M., Wilkinson H.H., Parker M.A. (1996) Evolution. V. 50, p. 146-154.
- Stephens P.M., Cooper J.E. (1988) Soil Biol. Biochem. V. 20, p. 465-470.
- Stoddard C.D. (1976) Farm. Chem. V. 139, p. 50-52.
- Strain S.R., Leung K., Whittam T.S., de Bruijn F.J., Bottomley P.J. (1994) Appl. Environ. Microbiol. V. 60, p. 2772-2778.
- Strain S.R., Whittam T.S., Bottomley P.J. (1995) Mol. Ecol. V. 4, p. 105-114.
- Streeter J.G. (1994) Can. J. Microbiol. V. 40, p. 513-522.
- Streeter J.G., Peters N.K., Salminen S.O., Pladys D., Zhaohua P. (1995) Plant Physiol. V. 107, p. 857-864.
- Streit W., Bjourson A.J., Cooper J.E., Werner D. (1993) FEMS Microbiol. Ecol. V. 13, p. 59-68.
- Streit W., Kosch K., Werner D. (1992) Biol. Fertil. Soils. V. 14, p. 140-144.
- Sullivan J.T., Eardly B.D., Van Berkum P., Ronson C.W. (1996) Appl. Environ. Microbiol. V. 62, p. 2818-2825.
- Sullivan J.T., Patrick H.N., Lowther W.L., Scott D.B., Rosson C.W. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 92, p. 8985-8989.
- Sutton W.D. (1983) In: W.J. Broughton (ed.) Nitrogen Fixation. V. 3. Legumes. Oxford Univ. Press, NY. P. 144-212.
- Thies J.E., Singleton P.W., Bohlool B.B. (1991) Appl. Environ. Microbiol. V. 57, p. 19-28.
- Thomas P.M., Golly K.F., Zyskind J.W., Virginia R.A. (1994) Appl. Environ. Microbiol. V. 60, p. 1146-1153.
- Tiwari R.P., Reeve W.G., Glenn A.R. (1992) FEMS Microbiol. Lett. V. 100, p. 107-112.
- Tiwari R.P., Reeve W.G., Dilworth M.J., Glenn A.R. (1996) Microbiol. V. 142, p. 601-610.
- Tong Z., Sadowsky M.J. (1993) Appl. Environ. Microbiol. V. 60, p. 581-586.
- Toro N. (1996) World J. Microbiol. Biotech. V. 12, p. 157-162.
- Trese A.T. (1995) Euphytica. V. 81, p. 279-282.
- Trinick M.J. (1982) In: W.J. Broughton (ed.). Nitrogen Fixation, V. 2: *Rhizobium*, Clarence Press, Oxford, England, p. 76-146.
- Triplett E.W. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 85, p. 3810-3814.
- Triplett E.W. (1990) Appl. Environ. Microbiol. V. 56, p. 98-103.
- Triplett E.W., Albrecht K.A., Oplinger E.S. (1993) Soil Biol. Biochem. V. 25, p. 781-784.
- Triplett E.W., Barta T.M. (1987) Plant Physiol. V. 85, p. 335-342.
- Triplett E.W., Sadowsky M.J. (1992) Ann. Rev. Microbiol. V. 46, p. 399-428.
- Triplett E.W., Schink M.J., Noeldner K.L. (1989) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 2, p. 202-208.
- Turco R.F., Sadowsky M.J. (1995) Bioremediation: Science and Applications, Soil Science Special Publication No. 43, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.
- Van Berkum P., Beyene D., Vera F.T., Keyser H.H. (1995) Appl. Environ. Microbiol. V. 61, p. 2649-2653.
- Van Egarat A.W.S.M. (1975) Plant and Soil. V. 42, p. 381-386.
- Van Rensburg H.J., Strijdom B.W. (1980) Soil Biol. Biochem. V. 12, p. 353-356.
- Vance C.P., Graham P.H. (1995) In: I. Tikhonovich et al. (eds.) Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, p. 77-86.
- Vargas A.A.T., Denardin N.D. (1992) R. Bras. Ci. Solo. V. 16, p. 337-342.
- Vargas A.A.T., Graham P.H. (1988) Field Crops Res. V. 19, p. 91-101.
- Vest G., Weber D.F., Sloger C. (1973) In: B.E.Caldwell (ed) Soybeans; Improvement, Production and Uses. Agronomy. V. 16, p. 353-390. Am. Soc. Agron., Madison, Wis.
- Vincent J.M. (1970) A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook No 15, Blackwell Scientific Publ. Oxford, p. 164.
- Viteri S.E., Schmidt E.L. (1987) Appl. Environ. Microbiol. V. 53, p. 1872-1875.
- Viteri S.E., Schmidt E.L. (1989) Soil Biol. Biochem. V. 21, p. 461-463.
- Vlassak K., Vanderleyden J., Franco A. (1996) Biol. Fert. Soils. V. 21, p. 61-68.

- Wadisirisuk P., Danso S.K.A., Hardarson G., Bowen G.D. (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 55, p. 1711-1716.
- Weaver R.W., Frederick L.R. (1974a) *Agron. J.* V. 66, p. 233-236.
- Weaver R.W., Frederick L.R. (1974b) *Agron. J.* V. 66, p. 233-236.
- Weaver R.W., Frederick L.R., Dumenil L.C. (1972) *Soil Sci.* V. 114, p. 137-141.
- Wexler M., Gordon D.M., Murphy P.J. (1996) *Microbiol.* V. 142, p. 1059-1066.
- Wilson D.O. (1975) *Agron. J.* V. 67, p. 76-78.
- Wilson K.J. (1995) *Soil Biol. Biochem.* V. 27, p. 501-514.
- Wilson K.J., Sessitsch A., Corbo J.C., Giller K.E., Akkermans A.D.L., Jefferson R.A. (1995) *Microbiol.* V. 141, p. 1691-1705.
- Winans S.C. (1992) *Microbiol. Rev.* V. 56, p. 12-31.
- Winarno R., Lie T.A. (1979) *Plant and Soil.* V. 51, p. 135-142.
- Woomer P., Singleton P.W., Bohlool B.B. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 54, p. 1112-1116.
- Young J.P.W., Haukka K.E. (1996) *New Phytol.* V. 133, p. 87-94.
- Young J.P.W., Wexler M. (1988) *J. Gen. Microbiol.* V. 134, p. 2731-2739.
- Zdor R.E., Pueppke S.G. (1991) *Can. J. Microbiol.* V. 37, p. 52-58.
- Zhang F., Lynch D.H., Smith D.L. (1995) *Environ. Experim. Bot.* V. 35, p. 279-285.

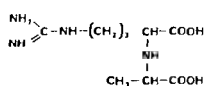
Опины и опин-подобные молекулы, вовлеченные во взаимодействия растений с бактериями семейства *Rhizobiaceae*

Дессо И., Пети А., Фарранд С.К., Марфи П.Д.

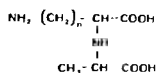
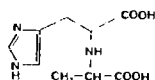
I.	Введение.....	199
II.	Формирование опиновой концепции.....	201
III.	Опин-подобные молекулы в бобово-ризобийном взаимодействии.....	203
IV.	Роль опинов во взаимодействии растений с агробактериями.....	208
IV.A.	Хемотаксис и опины.....	208
IV.B.	Агроцинопины.....	209
IV.B.1.	Открытие и химическая природа.....	209
IV.B.2.	Оперон <i>acc</i> и его регуляция.....	210
IV.B.3.	Другие агроцинопиновые системы.....	212
IV.B.4.	Агроцинопины, агроцин 84 и конкуренция за колонизацию корончатых галлов.....	213
IV.C.	Эволюция функций, связанных с опидами.....	213
IV.C.1.	Плазмиды маннитолового и аматориопинового типа: почвенное происхождение?.....	214
IV.C.2.	Ti-плазмиды нопалинового и октопинового типа: морское происхождение?.....	216
V.	Опины как ключевые факторы в растительно-агробактериальном взаимодействии.....	218
VI.	Куда ведет “опиновый след”?.....	219
VII.	Благодарности.....	220
VIII.	Литература.....	221

I. Введение

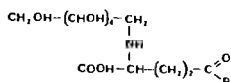
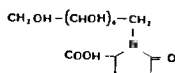
Первые данные об опидах появились в середине 50-х годов, когда на собрании Французского общества физиологов растений Морель (Morel, 1956) и Лайолет (Liolet, 1956) независимо друг от друга представили результаты своих исследований по метаболизму аргинина и идентификации необычных аминокислот в тканях корончатых галлов, индуцированных *Agrobacterium*. Эти опухолевые соединения были выделены и идентифицированы (рис. 1) как лизопин (Biemann et al., 1960), октопин (Ménagé, Morel, 1964), октопиновая кислота (Ménagé, Morel, 1965), нопалин (Goldmann et al., 1969) и получили общее название “опиды” (Tempé, Schell, 1977; Tempé, Goldmann, 1982). Значение метаболических превращений, происходящих в клетках корончатых галлов, несколько лет оставалось неясным, по большей части из-за того, что специфичность опинов как маркеров этих тканей долго подвергалась сомнению (Tempé, Goldmann, 1982). В понимании роли опинов в растительно-агробактериальном взаимодействии ключевыми стали три открытия: 1) штаммы *Agrobacterium* способны деградировать опины (Lejeune, Jubier, 1968); 2) природа синтезируемых в опухолях опинов зависит от инфицирующего штамма агробактерии, а не от растения, как это предполагалось ранее (Goldmann et al., 1968; Petit et al., 1970); 3) существует строгая корреляция между деградацией опинов агробактерией и их синтезом в опухолях: определенный штамм *A. tumefaciens* способен деградировать только те опины, которые синтезируются в образованных им опухолях (Petit et al., 1970; Tempé, Petit, 1983). Интересно, что эти особенности были немедленно



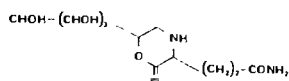
Октопин

Октопиновая кислота $n=3$
Лизопин $n=4$ 

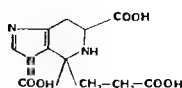
Гистопин

Маннопин $\text{R}=\text{NH}_2$
Маннопиновая кислота $\text{R}=\text{OH}$ 

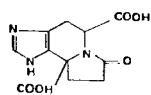
Агропиновая кислота



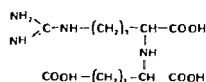
Агропин



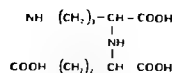
Кукумопин/Микимопин



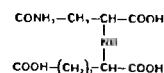
Лактам кукумопина/микимопина



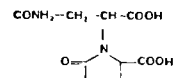
Нопалин



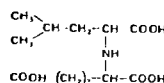
Нопалиновая кислота



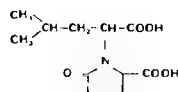
Сукцинамопин



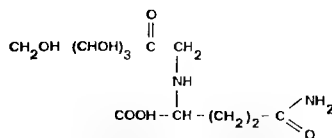
Лактам сукцинамопина



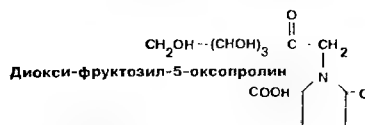
Лейцинопин



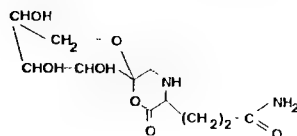
Лактам лейцинопина



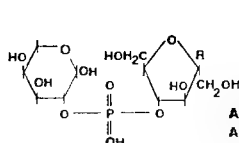
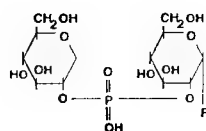
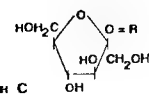
Диокси-фруктозил-глутамин (dfg)



Диокси-фруктозил-5-оксепролин



Хризопин (лактон dfg)

Агроцинопин A $\text{R}=\text{O}$
Агроцинопин B $\text{R}=\text{OH}$ Агроцинопин C $\text{R}=\text{O}$
Агроцинопин D $\text{R}=\text{OH}$ 

интерпретированы как указание на возможный перенос генов (Petit, Tourneuf, 1972). Подобная гипотеза была впервые предложена Брауном (1947) и Кляйном (1954) (Braun, 1982; Tempé, Petit, 1983), но только спустя годы стало ясно, что продукция опинов клетками корончатых галлов обеспечивает патогену селективное преимущество (Schell et al., 1979; Tempé et al., 1979). Пониманию этого способствовали: открытие Ti-плазмид (Zaenen et al., 1974; Van Larebeke et al., 1974; Watson et al., 1975), выяснение механизма опухолеобразования (Chilton et al., 1977; De Beuckeleer et al., 1978; Thomashow et al., 1980; Willmitzer et al., 1980), локализация на Ti-плазмидах генов, ответственных за синтез и деградацию опинов (Bomhoff et al., 1976; Montoya et al., 1977) и доказательство опин-индуцируемой конъюгационной активности Ti-плазмид (Kerr et al., 1977; Petit et al., 1978a). Все эти данные были собраны воедино и на их основе авторами "опиновой концепции" (Tempé et al., 1979) и "теории генетической колонизации" (Schell et al., 1979) была объяснена фундаментальная роль опинов в растительно-агробактериальном взаимодействии. Согласно этим теориям, опины — это специфические метаболиты, синтез которых в тканях корончатого галла запускается патогеном и которые служат для размножения последнего и способствуют распространению детерминант его вирулентности (Dessaux et al., 1992, 1993; Gelvin, 1992).

По нашему мнению, ценность работ по опинам прежде всего заключается в их биологическом значении, поскольку данные, накопленные при работе именно с этими молекулами, позволили ученым дать исчерпывающее описание растительно-агробактериального взаимодействия. Исследования опинов принесли ценную информацию о более тонких аспектах этого взаимодействия, таких как биоконтроль заболевания и эволюция Ti- и Ri-плазмид. Примечательно, что интерес к этим работам оказался шире и захватил не только растительно-агробактериальные взаимодействия. Опин-подобные молекулы, названные ризопинами, были обнаружены также в клубеньках, индуцированных на бобовых растениях различными штаммами *Rhizobium* (Murphy, Saint, 1992). Далее мы покажем, что наличие ризопинов в клубеньках связано с другим механизмом, так как эти соединения синтезируются бактероидами, а не клетками растения. Однако, также как и опины, ризопины являются селективным ростовым субстратом, хотя, возможно, этим их участие в растительно-микробных взаимодействиях не исчерпывается.

II. Формирование опиновой концепции

Сформулированная для ограниченного числа патогенных штаммов *A. tumefaciens*, опиновая концепция была оспорена из-за существования опухолей "нулевого типа", в которых к тому времени не было обнаружено известных опинов. При использовании здоровых растительных тканей в качестве контроля было показано, что экстракты опухолей нулевого типа содержат одно или более соединений (Firmin, Fenwick, 1977; Tate et al., 1982), которые специфически разлагаются нулевыми штаммами *Agrobacterium*, индуцировавшими опухоль (Guyon et al., 1980). Позднее эти соединения были идентифицированы как маннитоловые опины (маннопин, агропин, маннопиновая и агропиновая кислоты; рис. 1). Сходный подход, основанный на анализе роста различных штаммов *Agrobacterium* на экстрактах здоровых или опухолевых тканей, был использован для идентификации опинов сукцинамопинового семейства в других опухолях нулевого типа (Chilton et al., 1984a, 1984b). Обнаружение опинов в опухолях нулевого типа способствовало окончательному утверждению опиновой концепции. Однако в настоящее время все еще существует необходимость значительного расширения этой концепции и выхода ее за рамки взаимодействия растений с агробактериями.

Опиновая концепция в основном развивалась на основе данных о взаимодействии растений с *A. rhizogenes*. Для специалистов-фитопатологов *A. rhizogenes* и *A. tumefaciens* различаются типом вызываемого ими заболевания (Kerstens, De Ley, 1984). *A. tumefaciens* вызывает опухолевый рост растительных клеток (Smith, Townsend, 1907), тогда как *A. rhizogenes* — образование дополнительных корней в месте заражения (Riker et al., 1930). Тем не менее, образование корней при заражении *A. rhizogenes* имеет больше сходства с опухолеобразованием, вызванным *A. tumefaciens*, чем кажется на первый взгляд. Поэтому именно этот тип взаимодействия был выбран для дальнейшей разработки опиновой концепции. Уместность подобного выбора подтверждена тем, что опины

Таблица 1. Классификация Ti- и Ri-плазмид в зависимости от типа опинов.

Классификация Ti- и Ri-плазмид		
Тип плазмиды	Опиновый маркер	Опин(ы), индуцирующие перенос плазмиды
Ti-плазмиды		
Октопиновый	Октопин, октопиновая кислота, лизопин, гистопин, агропин, маннопин, агропиновая и маннопиновая кислоты	Октопин, октопиновая кислота, лизопин
Нопалиновый	Нопалин, нопалиновая кислота, агроцинопины A+B	Агроцинопины A+B
Агропиновый	Агропин, маннопин, агропиновая и маннопиновая кислоты, агроцинопины C+D, лейцинопин, лактам лейцинопина, L,L-сукцинамопин	Агроцинопины C+D
Сукцинамопиновый	D,L-сукцинамопин, лактам сукцинамопина, сукцинопин, нопалин ^a	Не известны
<i>Lippia</i>	Агроцинопины C+D ^a	Не известны
Хризопин/сукцинамопиновый	Хризопин, деокси-фруктозил-5-оксопролин (ДФОП), L,L-сукцинамопин, L,L-лейцинопин	Не известны
Хризопин/нопалиновый	Хризопин, деокси-фруктозил-5-оксопролин (ДФОП), нопалин	Не известны
Виноградный I	Октопин ^b , кукумопин	Не известны
Виноградный II	Нопалин	Не известны
Виноградный III	Витопин, ридеопин	Не известны
Ri-плазмиды		
Агропиновый	Агропин, маннопин, агропиновая и маннопиновая кислоты, агроцинопины A+B	Не известны
Маннопиновый	Маннопин, агропиновая и маннопиновая кислоты, агроцинопины C+D	Не известны
Кукумопиновый	Кукумопин, лактам кукумопина	Не известны
Микимопиновый	Микимопин, лактам микимопина	Не известны

^aЭти соединения, возможно, деградируются бактериями, несущими соответствующие плазмиды, однако их наличие в опухолях или бородачатых корнях пока не показано.

^bНаличие октопиновой кислоты или лизопина в опухолях не изучалось.

выявляются в тканях культур бородачатых корней с использованием простых тестов на появление и деградацию опинов (Petit et al., 1983; Isogai et al., 1988; Davioud et al., 1988).

В совокупности с перечисленными данными, тот факт, что опины синтезируются в бородачатых корнях штаммоспецифично, послужил первым указанием на то, что взаимодействие растений с *A. rhizogenes* является результатом генетического переноса (Biro et al., 1987; Tepfer, 1989). Физиологические, генетические и молекулярные данные показывают, что плазмида (названная Ri, от: root-inducing) является главной детерминантой патогенности *A. rhizogenes* (White, Nester, 1980) и участвует в переносе ДНК из бактерии в клетки растений в ходе инфекционного процесса (Chilton et al., 1982; White et al., 1982; Spano et al., 1982). Дальнейшие исследования показали, что гены, участвующие в биосинтезе опинов, локализованы в T-ДНК Ri- и Ti-плазмид (Barker et al., 1983; Gielen et al., 1984; Slightom et al., 1986). Детерминанты, вовлеченные в деградацию опинов, обычно локализованы на Ri-плазмидах. Однако, в отличие от *A. tumefaciens*, некоторые из этих детерминант также локализованы в другом репликоне, который может объединяться с Ri-плазмидой в

некоторых штаммах *A. rhizogenes* (Petit et al., 1983; Jouanin, 1984; Hufmann et al., 1984; Jouanin et al., 1986). Ни один из опинов, присутствующих в экстрактах бородатых корней, не индуцирует конъюгативный перенос Ri-плазмиды, который, по-видимому, происходит конститутивно, что отличает их от Ti-плазмид (данные авторов). В совокупности эти данные подтверждают то, что опины являются ключевыми медиаторами в агробактериально-растительном взаимодействии. Синтезируемые за счет метаболитов трансформированных растительных клеток, опины обеспечивают патогенов азотом, углеродом и энергией, необходимыми для размножения самих бактерий и для распространения Ti(Ri)-плазмид.

К настоящему времени известно более 20 разновидностей опиновых молекул. Как указано выше, их наличие в разрастаниях типа корончатых галлов и бородатых корней зависит от Ti(Ri)-плазмиды (Dessaux et al., 1992, 1993). Это дает основу для элементарной, но полезной классификации плазмид (табл. 1). Возможно, эта классификация не самая верная, так как предполагает структурное и функциональное родство Ti-плазмид *A. vitis* (возбудителя корончатых галлов *Vitis vinifera*). Многочисленные исследования указывают на то, что Ti-плазмиды, возможно, возникли как "мозаичные" структуры, составленные из различных по происхождению участков, включая консервативные районы (Т-ДНК, гены вирулентности) и варибельные районы, ответственные за деградацию опинов (Paulus et al., 1991a, 1991b; Otten et al., 1992, 1993; Van Nuenen et al., 1993; Otten, De Ruffray, 1994). Основанная на подобном критерии классификация может искусственно увеличивать эволюционное "расстояние" между плазмидами, которые при других условиях могли бы оказаться родственными. Мозаичная структура возможно, также характерна для Ti-плазмид *A. tumefaciens*, частично состоящих из гомологичных участков (Т-ДНК, *vir*-гены: рис. 2).

III. Опин-подобные молекулы в бобово-ризобийном взаимодействии

В начале 80-х г.г. были предприняты первые попытки выявить опин-подобные молекулы у *Rhizobium*. Основанием для подобной постановки вопроса послужило то, что патогенные и симбиотические взаимодействия сходны между собой, а ризобии и агробактерии принадлежат к одному семейству Rhizobiaceae. Первые опыты были проведены на *Sinorhizobium meliloti*, так как этот вид бактерий особенно сходен с *Agrobacterium*. При изучении 20 штаммов *S. meliloti* был обнаружен штамм L5-30, который в ассоциации с растением продуцировал опин-подобное соединение. Оно было выявлено следующим образом: растения люцерны инокулировали ризобиями, образовавшиеся клубеньки собирали, мацерировали и удаляли неспецифические источники углерода и азота инкубированием с агробактерией. Затем изучали рост исходного штамма ризобий на минимальной среде с полученным экстрактом. Рост бактерий указывал на присутствие опин-подобного соединения, что связывало бактериальную индукцию его синтеза в растении с катаболизмом свободноживущей бактерией. Это соединение было идентифицировано как 3-О-метил-сцилло-инозамин (3-О-MSI; рис. 3) и названо ризопином (Murphy et al., 1987). В настоящее время ризопины определяют как клубенек-специфичные соединения, синтезируемые бактериоидами и катаболизируемые ризобиями, вызвавшими клубенькообразование (Murphy, Saint, 1992; Murphy et al., 1995). Их функцией является воздействие на внутривидовую конкуренцию за образование клубеньков (Gordon et al., 1996).

Бесспорным пунктом опиновой концепции является то, что гены синтеза опинов переносятся в растение посредством Т-ДНК и их экспрессия находится под контролем растительных промоторов. Молекулярные исследования показали, что в случае ризопиновой системы это не так. Однако аналогия ризопинов с опином значительна: хотя ризопиновые гены не интегрируются в растительную ДНК и не контролируются растительными промоторами, они экспрессируются в бактериоидах (при фиксации азота), влияют на симбиоз и контролируются симбиотическим промотором.

При взаимодействиях с ризобиями растения-хозяева синтезируют большое количество соединений (трофических медиаторов) типа калистегинов, бетаинов, гомосерина и мимозина, которые могут служить для ризобий источниками азота и углерода (Van Egeraat, 1975; Tepfer et al., 1988a, 1988b; Boivin et al., 1990a, 1990b; Soedarjo et al., 1994). Ни одно из них не похоже на опины

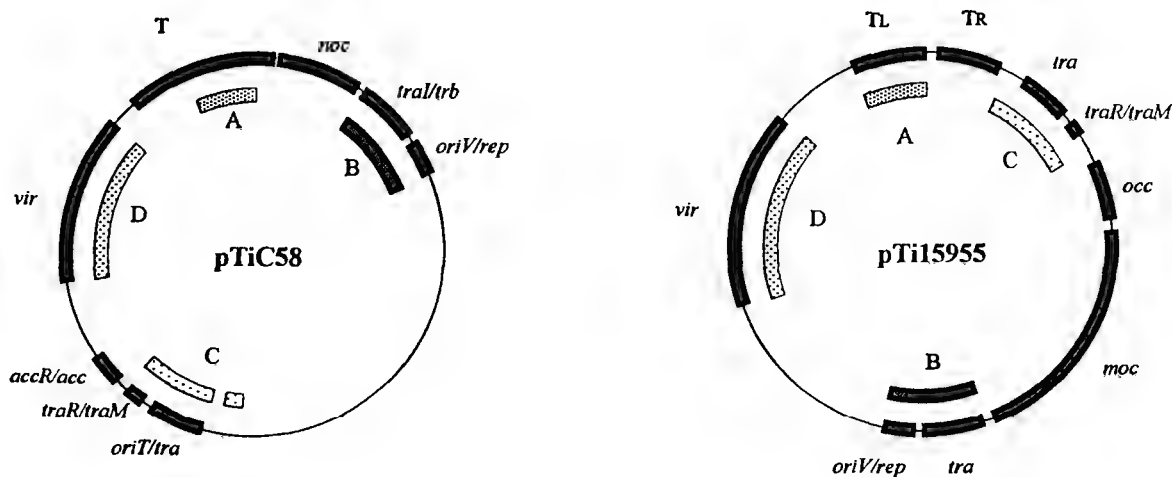


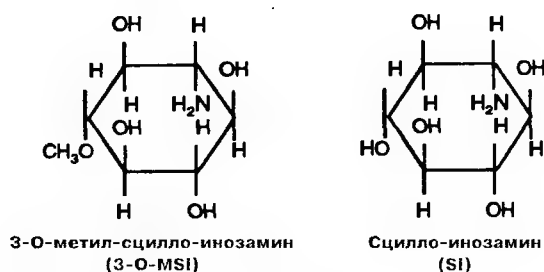
Рисунок 2. Функциональная организация Ti-плазмид.

Для pTiC58: T – T-ДНК; *noc*, катаболизм нопалина; *traI/trb*, район, ответственный за перенос; *oriV/rep*, ориджин репликации; *oriT/tra*, ориджин переноса; *traR/traM*, район, участвующий в регуляции переноса; *accR/acc*, катаболизм агроцинопина; *vir*, область вирулентности. Для pTi15955 те же обозначения, кроме: TL и TR, правая и левая части T-ДНК, соответственно; *occ*, катаболизм октопина; *moc*, катаболизм маннитоловых опинов. Области A, B, C и D двух плазмид гомологичны.

или ризопины, так как их синтез не индуцируется катаболизирующим штаммом. Как было показано, катаболизм ризопинов является по отношению к штаммам, их продуцирующим, гораздо более специфичным, чем катаболизм опинов, которые используются широким спектром микроорганизмов, а не только штаммом-индуктором опухолеобразования (Beauchamp et al., 1990). К настоящему времени ризопины обнаружены только у ризобий, но не выявлены у других бактерий, ассоциированных с растениями (Rossbach et al., 1995).

Штаммы *A. tumefaciens* в соответствии с типом опинов, синтезируемых опухолями и катаболизируемых бактериями, разделены на 7 классов (табл. 1). В случае ризопинов дело обстоит иначе. В развернутом исследовании, проведенном на более чем 330 штаммах *S. meliloti* и *R. leguminosarum* bv. *viceae*, обнаружено 25 ризопиновых штаммов. Ни одного ризопин-синтезирующего штамма не описано для *R. etli*, *R. tropici* или *R. leguminosarum* bv. *trifolii* и bv. *phaseoli* (Wexler et al., 1995). 24 штамма индуцировали образование 3-O-MSI, а 1 штамм – близкого *сцилло*-инозамина (SI; рис.3) (Wexler et al., 1995). Неудача с обнаружением ризопиновых штаммов у определенных видов может объясняться тем, что они присутствуют в популяции с низкими частотами. Можно предположить также недоступность растительных предшественников для синтеза ризопинов или отсутствие селективного преимущества у ризопин-синтезирующих штаммов упомянутых видов.

У *S. meliloti* и *R. leguminosarum* bv. *viceae* 11-12% штаммов обладают способностью синтезировать ризопины. Поскольку ризопины играют важную роль во внутривидовой конкуренции, обоснованным выглядит то, что не все штаммы в пределах вида синтезируют ризопины, иначе ни один штамм не имел бы преимущества. В равной мере допустимо, что другие штаммы могут синтезировать не идентифицированные пока соединения, подходящие под определение ризопинов. Тем не менее, все еще вызывает недоумение вопрос: почему только около 10% штаммов продуцируют ризопины? Для ответа на этот вопрос было изучено генетическое родство синтезиру-

Рисунок 3. Структуры ризопинов, синтезируемых *Rhizobium*.

ющих и не синтезирующих ризопины штаммов. Ризопиновые штаммы *S. meliloti* и *R. leguminosarum* bv. *viciae* проанализировали путем электрофореза изоформ 14 разных ферментов. Оказалось, что ризопиновый фенотип не связан с типом хромосомы, но зависит от типа *Sym*-плазмиды (Wexler et al., 1995). В географическом отношении ризопиновые штаммы также оказались широко распространены, что скорее всего является следствием их интродукции вместе с культурными видами *Medicago* и *Pisum*, а не результатом конвергентной эволюции (Wexler et al., 1995).

Первоначально изучение ризопиновых генов проводили на штаммах L5-30 и Rm220-3 *S. meliloti*, выделенных в разных географических районах. У обоих штаммов гены, вовлеченные в биосинтез (*mos*) и катаболизм (*moc*) ризопинов, тесно сцеплены и локализованы на крупной *nod-nif*-плазмиде, необходимой для симбиоза (Murphy et al., 1987; Saint et al., 1993). Кроме того, у других 25 ризопиновых штаммов гены биосинтеза и катаболизма ризопинов также расположены на *Sym*-плазмиде (Wexler et al., 1995). Сцепление генов биосинтеза и катаболизма ризопинов и их локализация на *Sym*-плазмиде позволяет предположить, что эти гены эволюционировали как часть многокомпонентного полифункционального репликона, вовлеченного в симбиоз. Важно также то, что локус *mos* регулируется генами *nifA/ntrA* — теми же, что и симбиотическая азотфиксация (Murphy et al., 1988; Saint et al., 1993). Это говорит о том, что работа *mos*-локуса сопряжена с фиксацией азота (Gussin et al., 1986) и, возможно, контролируется низким уровнем кислорода (Ditta et al., 1987), что указывает на симбиотические функции генов.

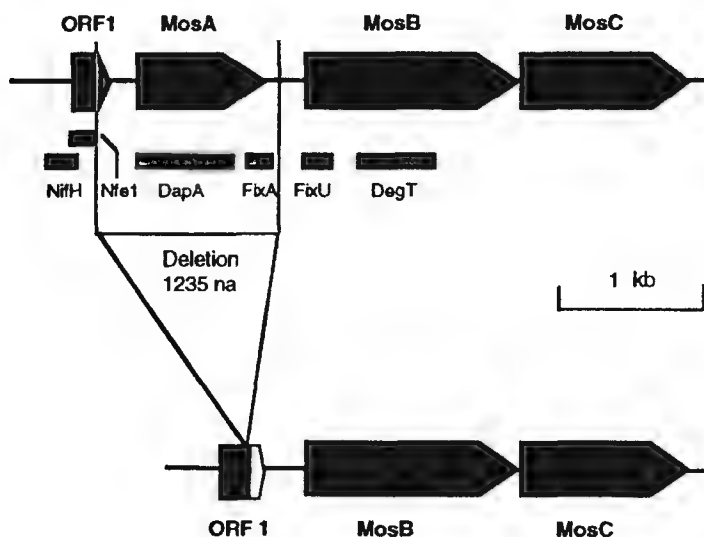
У штаммов L5-30 и Rm220-3 *mos*-локус (рис. 4) представляет собой оперон, регулируемый *nifA/ntrA*-регулируемым промотором. *mos*-локус штамма L5-30 содержит 4 открытые рамки считывания, названные *ORF1* и *mosABC* (Murphy et al., 1993). Ген *mosA* отсутствует у штамма Rm220-3 (что приводит к образованию преимущественно SI, а не 3-О-MSI), но оставшиеся последовательности на 98% гомологичны соответствующим генам штамма L5-30 (Rao et al., 1995). *ORF1* содержит области (включая лидерную последовательность и 5'-район кодирующей последовательности), общие с геном *nifH*, кодирующим субъединицу нитрогеназы (Hageman, Burns, 1978), а также фланкирован *nifA/ntrA*-регулируемым промотором (как и *nifH*). Так как *ORF1* не транслируется в *Rhizobium* и мутации типа сдвига рамки считывания не блокируют образование ризопина (Murphy et al., 1993; Rao et al., 1995), считается, что его основной функцией является связывание *mos*-оперона с *nifA*-регулируемым промотором. Таким образом, в процессе эволюции *mos*-оперон приобрел копию гена *nifH*, включив промотор последнего для симбиотической регуляции синтеза ризопина.

Функция белка MosA установлена в ходе химических и генетических исследований. Так как ген *mosA* отсутствует у Rm220-3 (Rao et al., 1995) и этот штамм синтезирует преимущественно сцилло-инозамин (SI), а не 3-О-MSI (Saint et al., 1993), высказано предположение о том, что MosA участвует в метилировании ризопина. Это подтверждено путем делеции гена *mosA* из *mos*-локуса штамма L5-30, что привело к преимущественному синтезу бактериями SI. Интересно, что MosA не обладает гомологией с известными метилазами; и таким образом его роль в метилировании ризопина остается неизвестной. Белок MosB, по-видимому, играет регуляторную роль, так

как его центральный домен обладает гомологией с широким кругом белков, участвующих в синтезе антибиотиков или компонентов клеточной стенки. Этот домен характерен для регуляторных белков DegT и DnrJ, обладающих мотивом “спираль-поворот-спираль”. Функция MosB может заключаться в переключении предсуществующих биосинтетических путей на синтез ризопина. Однако так как значительная часть белка MosB находится вне этого домена, возможно, он обладает и ферментативной функцией (Murphy et al., 1993). MosC содержит 12 трансмембранных доменов и, по данным иммунодетекции, ассоциирован с мембраной бактериоида. Возможно, MosC играет транспортную роль, участвуя в переносе предшественника ризопина в бактериоиды, или наоборот, в удалении конечного продукта биосинтеза из бактериоидов. Хотя ризопин синтезируется в бактерио-

А. Биосинтез ризопина (mos)

L5-30



Rm220-3

В. Катаболизм ризопина (moc)

L5-30



Рисунок 4. Ризопиновые гены *Rhizobium meliloti*.

А. Гены биосинтеза ризопинов (локус *mos*). Черные стрелки соответствуют открытым рамкам считывания, гомологичным у штаммов Rm220-3 и L5-30, полосы указывают на районы гомологии известным генам (Rao et al., 1995).

В. Гены катаболизма ризопинов (локус *moc*) штамма L5-30 (Rossbach et al., 1994).

идах, он быстро удаляется из места синтеза, так как в изолированных бактериоидеах это соединение не обнаружено (данные авторов).

В целом, локус *mos* обладает мозаичной структурой, и его отдельные участки гомологичны генам симбиотической азотфиксации - *fixU*, *fixA*, *nifH* (Murphy et al., 1993). Подобная структура напоминает “горячую точку” перестроек, происходящих в пределах локуса. Вблизи локуса *mos* расположены симбиотические промоторы, которые потенциально могут обеспечивать транскрипцию небольших рамок считывания. Заманчиво предположить, что подобная структура является примером естественных конструкций типа промотор-ген, представляющих фальш-старт для генов, входящих под контроль симбиотических промоторов. Сходные фальш-старты наблюдают вблизи генов симбиотической фиксации у других штаммов *Rhizobium* (Better et al., 1983).

Пути биосинтеза ризопинов неясны. На основе структурного сходства можно предположить, что часть системы напоминает ранние этапы синтеза стрептидина у *Streptomyces* spp. (Walker, 1995). Независимо от пути биосинтеза, ризопины образуются в бактериоидеах из предшественников растительного происхождения. Однако ими не являются C4-карбоксильные кислоты, которые играют важную роль в азотфиксации у *S. meliloti* (Dilworth, Glenn, 1984), так как у мутанта по гену *dctA* с нарушенным транспортом этих соединений в клубеньки, способность к синтезу ризопинов не изменена (данные авторов).

Гены катаболизма ризопина (*mos*), позволяющие ризобиям расти в присутствии ризопина как единственного источника С, активны в свободноживущих бактериях. Нет причин предполагать их экспрессию в бактериоидеах, как это наблюдается для других трофических медиаторов, например, тригонеллина (Bolvin et al., 1990a; 1990b). Эти гены первоначально были выделены из штамма L5-30 *S. meliloti* в составе фрагмента длиной 15 т.п.н., тесно сцепленного с локусом *mos* (Murphy et al., 1987). Недавно количество *mos*-генов было расширено до 4, обозначенных *mosABRC* (рис. 4; Rossbach et al., 1994a). Анализ последовательностей показал, что *mosA* и *mosB*, скорее всего, кодируют деградацию и транспорт инозитола, а *mosR* обладает регуляторной функцией. Ген *mosC* не обладает гомологией с известными последовательностями ДНК. *MosR* гомологичен бактериальным регуляторным белкам класса GntR. Также как и в случае с генами *mos*, для обеспечения катаболизма ризопинов эти гены, по-видимому, взаимодействуют с другими генами бактерий. Гены катаболизма ризопинов высококонсервативны в пределах вида и у разных видов. Так, по данным ПДРФ (RFLP)-анализа, у 12 штаммов *R. leguminosarum* bv. *viceae* дивергенция составляет всего 0,5%, а у 13 штаммов *S. meliloti* – 1,6% (Wexler et al., 1996).

Поскольку ризопины были обнаружены по аналогии с опиными агробактерий и являются источниками С, сначала предполагалось, что они могут функционировать так же, как и опины. Если это верно, то ризопины могут представлять собой селективные ростовые субстраты, увеличивающие в ризосфере долю ризопин-катаболизирующих штаммов и, как следствие, долю этих бактерий в клубеньках. Ранние опыты, проведенные на мутантах с инактивированными Tn5 генами синтеза ризопина показали, что ризопины действительно влияют на конкурентноспособность штаммов при нодуляции (Putnoky et al., 1992; Murphy et al., 1995). Более развернутое исследование, которое велось в течении 12 месяцев на растениях в почве, позволило расширить эти выводы. Ризопин-продуцирующий штамм L5-30 *S. meliloti* дикого типа и его Tn5-мутанты с нарушениями синтеза или катаболизма ризопинов, были использованы для инокуляции люцерны в условиях конкуренции. Опыты показали, что способность к синтезу ризопина не дает бактериям конкурентного преимущества, тогда как катаболизм ризопина дает такое преимущество. Эти данные показывают, что при конкуренции с мутантом, имеющим нарушения в катаболизме ризопина, способность к его утилизации повышает скорость клубенькообразования. Так как селективное преимущество реализуется в течение первых недель и со временем не изменяется, это исследование не согласуется с гипотезой о том, что единственной функцией ризопинов является создание приемлемого субстрата для роста свободноживущей популяции ризопин-продуцирующего штамма. Хотя ризопины и являются специфическим субстратом вне растения (в этом отношении сходны с опиными), *in planta* они, судя по всему, действуют по иному механизму.

Ризопиновые гены оказались важны с точки зрения эволюции симбиоза. Когда гены синтеза и катаболизма ризопинов были изучены детально, стало очевидно, что один и тот же промотор

используется как для снабжения растения азотом (*nifH*), так и для образования ризопина, дающего селективное преимущество бактериям при образовании клубеньков. Возможно, бактерии и растения получают специфическую выгоду от симбиоза — явление, природа которого до сих пор полностью не изучена. Хотя первоначально выделение ризопинов опиралось на их сходство с опинами агробактерий, сейчас очевидно, что они представляют собой важный продукт растительно-микробного симбиоза, но работают по иному механизму, нежели опины.

IV. Роль опинов во взаимодействии растений с агробактериями

В течение последних лет получены важные данные о роли опинов во взаимодействии агробактерий с растениями. Один из аспектов этих исследований, касающийся тонкой регуляции конъюгативного переноса Ti-плазмид, рассматривается в главе 10. Здесь мы подробнее остановимся на следующих вопросах: 1) роль опинов как хемоаттрактантов, 2) агроцинопины и агроцины, 3) эволюция функций, связанных с опинами, изучение которой значительно расширит понимание их роли в агробактериальной трансформации.

IV.A. ХЕМОТАКСИС И ОПИНЫ

Как и большинство других подвижных грам-отрицательных бактерий, представители рода *Agrobacterium* обладают хемотаксисом по отношению к ряду соединений (Loake et al., 1988; Vande Broek, Vanderleyden, 1995). Особый интерес представляет то, что эксудат покровных клеток корня обладает сильным аттрагирующим эффектом для *Agrobacterium* (Hawes et al., 1988; Hawes, Smith, 1989). Хотя до сих пор ведутся споры относительно необходимости генов *virA* и *virG*, работы двух групп исследователей показали, что фенольные соединения — активаторы *vir*-генов являются хемоаттрактантами для агробактерий (Parke et al., 1987; Ashby et al., 1988; Shaw et al., 1988). Эти данные позволяют предположить, что хемотаксис играет важную роль в привлечении агробактерий к растению-хозяину и, возможно, к местам поранения. Это предположение подтверждается следующим наблюдением: мутанты *A. tumefaciens* с нарушенным хемотаксисом, хотя и сохраняют способность к индукции опухолей в стандартном тесте при инокуляции растения, авирулентны при инокуляции почвы, в которой находится растение (Hawes, Smith, 1989).

Недавно мы показали, что штаммы *Agrobacterium* могут реагировать на опины. Хемотаксис зависит от плазмид, кодирующих не изученные пока функции катаболизма опинов. Штаммы с Ti-плазмидами нопалин/агроцинопинового типа привлекаются нопалином и агроцинопинами A+B, но не октопином, тогда как штаммы с плазмидами октопин/маннитолового типа реагируют на октопин, но не на маннопин, нопалин или агроцинопины A+B. Генетический и молекулярный анализ позволил локализовать факторы, ответственные за положительный хемотаксис, в локусе катаболизма опинов Ti-плазмид. Более того, анализ мутантов и субклонов позволяет предположить, что для положительного хемотаксиса необходим один ген, кодирующий периплазматический связывающий белок, ассоциированный с транспортной системой. Мутации, затрагивающие другие компоненты транспортных систем, или гены, кодирующие ферменты катаболизма опинов, не оказывают влияния на хемотаксис. Это совпадает с данными, полученными на других системах, в которых периплазматические связывающие белки, ассоциированные с транспортной системой ABC-типа, отвечают за хемотаксис по отношению к сходным субстратам (Higgins, 1992).

Интригующим является то, что некоторые продукты Ti-плазмид обладают высоким сходством с метил-связывающими белками хемотаксиса (methyl-accepting chemotaxis proteins, Mcp) других бактерий. Эти белки связаны с мембраной первичными передатчиками сигнала в системе хемотактической реакции (Stock et al., 1987; Lukat, Stock, 1993; Stock, Mowbray, 1995). Более того, *mcp*-подобные гены являются компонентами оперонов, вовлеченных в катаболизм опинов. Например, оперон, расположенный между локусами *tra* и *acc* плазмиды pTiC58, содержит *mcp*-подобный ген (данные авторов). Экспрессия этого гена, также как и всего оперона, регулируется агроцинопинами A+B через белок AccR (см. ниже), что позволило предположить участие продукта этого *mcp*-подобного гена в реакции на сахар-содержащие опины. Однако инсерции в этом гене

не влияют на хемотаксис по отношению к агроцинопинам А+В, то есть *mcp*-подобный ген не участвует в хемотаксисе на опины. Возможно, что у этих бактерий рецепторы МСР, узнающие комплекс “периплазматический белок-опин(ы)”, кодируются генами, расположенными на хромосоме. Возможно также, что белки МСР некоторых агробактерий или других бактерий, способных реплицировать Ti-плазмиды, могут не узнавать эти сигналы, так как для этого требуются дополнительные белки МСР, кодируемые Ti-плазмидой.

В рамках опиновой концепции рассматривается несколько возможных функций хемотаксиса. Во-первых, он может позволять опин-катаболизирующей бактерии, свободной или “вышедшей” из опухоли, вернуться обратно в опухоль, богатую питательными веществами. Во-вторых, он может служить для привлечения штаммов *A. tumefaciens* с несколько разными Ti-плазмидами. Они, в свою очередь, могут рекомбинировать с Ti-плазмидами бактерий, находящихся в опухоли, в результате чего возникают новые Ti-плазмиды. И наконец, хемотаксис на опины может существовать для привлечения в опухоли непатогенных опин-катаболизирующих штаммов *A. radiobacter*. Это, несомненно, ценно для данных бактерий, неспособных самостоятельно формировать опухоли и потому ограниченных в своем паразитизме опухолями, индуцированными вирулентными штаммами. В случае штамма К84 *A. radiobacter* это явление пошло еще дальше. Штамм К84 обладает положительным хемотаксисом по отношению к опухолям, синтезирующим нопалин и агроцинопины А+В – субстратам, которые бактерия катаболизирует благодаря крупной плазмиде (Clare et al., 1990; Haymann, Farrand, 1990). Более того, попав в опухоль, эта бактерия приобретает селективное преимущество благодаря синтезу агроцина 84 – антибиотика, подавляющего вирулентные агробактерии (Roberts et al., 1977; Murphy, Roberts, 1979; Kerr, 1980). Тот факт, что поглощение и активация агроцина 84 находится под контролем агроцинопин-катаболизирующей Ti-системы *A. tumefaciens*, только придает законченность этой элегантной системе паразитизма.

IV.В. АГРОЦИНОПИНЫ

IV.В.1. Открытие и химическая природа

Открытие агроцинопинов придало опиновой концепции новое направление. Было известно, что анти-агробактериальный антибиотик агроцин 84, продуцируемый штаммом К84 *A. radiobacter*, является штаммо-специфичным. Этот антибиотик ингибирует рост только определенных штаммов *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*, а чувствительность к нему связана с типом Ti- или Ri-плазмиды (Farrand, 1991). Высказано предположение о том, что специфичность агроцина 84 может быть связана с его способностью имитировать неизвестный опин, синтезируемый опухолью, вызванной агроцин-чувствительным штаммом. Если это так, то в присутствии опиона чувствительность штамма к агроцину должна резко увеличиться. Предположение оказалось верным: в опухолях, индуцированных агроцин 84-чувствительными штаммами *A. tumefaciens*, обнаружено неизвестное соединение, которое вызывало супер-чувствительность бактерий к антибиотик (Ellis, Murphy, 1981). Это соединение может быть поглощено и катаболизировано только теми бактериями, чья Ti-плазмида: 1) вызывала образование опухоли, из которой соединение выделено, 2) придавала чувствительность к агроцину 84. Этот факт подтвердил опиновую природу соединения и позволял тесно связать его с чувствительностью к агроцину 84. Подобная активность определяется двумя совместно мигрирующими соединениями, которые из-за сходства с агроцином 84 названы агроцинопинами А и В (рис. 1).

Химический анализ показал, что новые опины не похожи на все ранее открытые опухолевые метаболиты. Действительно, агроцинопины А и В оказались фосфодиэфирами сахаров. Агроцинопин А содержит арабинозу в положении С4 фруктозного остатка сахарозы, тогда как агроцинопин В отличается только отсутствием глюкозного остатка сахарозы (рис. 1; Ryder et al., 1984). Неизвестно, синтезируется ли агроцинопин В из агроцинопина А или же они образуются параллельно. Это семейство опинов ассоциировано с классическими Ti-плазмидами нопалинового типа и определенными плазмидами катаболизма опинов *A. tumefaciens* и *A. radiobacter* (Haymann, Farrand, 1990). Идентифицирована и вторая пара агроцин-подобных опинов, получивших название агроцинопинов С и D (Ellis, Murphy, 1981). С химической точки зрения, агроцинопин С является фосфо-

диэфиром глюкозы и сахарозы, связь осуществляется через C2-атомы обоих остатков глюкоз. Агроцинопин D сходен с ним, но не содержит фруктозного остатка. Более того, глюкозный остаток находится в равновесии между фуранозидной и пиранозидной формами. Агроцинопины C+D обнаружены в опухольях, индуцированных штаммами с классической агропиновой Ti-плазмидой pTiBo542 (Ellis, Murphy, 1981) или мега-Ti-плазмидами агробактерий *Lippia*-типа (Unger et al., 1985).

Изоляты *Agrobacterium* spp., чувствительные к агроцину 84, могут катаболизировать агроцинопины A+B и агроцинопин D, но не агроцинопин C (Ellis, Murphy, 1981). Интересно, что хотя агроцинопин C и не катаболизируется, он защищает штаммы агроцинопин A+B-типа от ингибирующего действия агроцина 84. Штаммы, способные к катаболизму агроцинопинов C+D, не обладают чувствительностью к агроцину 84. Однако, они приобретают ее при предварительном культивировании с одним из этих двух опинов.

Существует несколько доказательств того, что чувствительность к агроцину 84 связана с серией плазмидных генов, ответственных за поглощение и катаболизм агроцинопинов. Во-первых, этой чувствительностью обладают только агроцинопин-продуцирующие штаммы. Во-вторых, мутации, устраняющие чувствительность к антибиотику, приводят к потере способности поглощать и катаболизировать опины. В-третьих, мутации, обеспечивающие высокий конститутивный уровень экспрессии локуса катаболизма опинов, приводят к суперчувствительности клеток к агроцину 84. В-четвертых, наличие агроцинопинов ингибирует поглощение радиоактивно меченого агроцина 84, причем поглощение агроцина 84 происходит через высокоаффинную энергетически зависимую систему (Murphy, Roberts, 1979). Эта система включает периплазматический белок, который специфически связывается с антибиотиком, и наличие этого белка зависит от Ti-плазмиды, обеспечивающей чувствительность к агроцину 84 и катаболизм опинов.

IV.B.2. Оперон *acc* и его регуляция

Недавно клонирован и секвенирован участок плазмиды pTiC58, ответственный за катаболизм агроцинопинов A+B (Haymann, Farrand, 1988; Haymann et al., 1993). При этом удалось выявить оперон, расположенный между отметками в 125 и 134 т.п.н. Ti-плазмиды и состоящий из 8 открытых рамок считывания, *accR* и *accA-accG* (рис. 5). Этих генов достаточно для поглощения и катаболизма опинов как единственных источников углерода (Haymann et al., 1993). Первый ген *accR* кодирует белок-репрессор *acc*-оперона (Beck von Bodman et al., 1992): мутации в *accR* приводят к суперчувствительности к агроцину 84 и значительно увеличивают скорость поглощения как опинов, так и антибиотика (Haymann, Farrand, 1988; Beck von Bodman et al., 1992). Следующие пять генов, *accABCDE*, кодируют АТФ-зависимую транспортную систему ABC-типа, включающую периплазматический связывающий белок (данные авторов). AccA обладает гомологией с белками других транспортных систем ABC-типа, расположен в периплазматическом пространстве (Haymann et al., 1993) и, по-видимому, идентичен агроцин 84-связывающему белку (Murphy, Roberts, 1979). Таким образом, компоненты транспортной системы сходны с компонентами систем, отвечающих за перенос ди- и олигопептидов у *E. coli* и *Salmonella typhimurium* (данные авторов).

Последние два гена, *accF* и *accG*, возможно, кодируют ферменты, участвующие в катаболизме опинов. AccF сходен с UgpQ, глицерол-фосфодиэфирфосфодиэстеразой *E. coli*, и это позволяет предполагать, что белок является фосфодиэстеразой, расщепляющей опины на остатки сахаров. В соответствии с этим, мутации в гене *accF* приводят к потере способности бактерий расти в присутствии агроцинопинов A+B как единственных источников углерода. Эти мутации устраняют также чувствительность к агроцину 84 — явление, которое указывает на необходимость процессинга антибиотика в клетке. Интересно, что мутанты по *accF* по-прежнему поглощают агроцин 84, таким образом, продукт этого гена, по-видимому, не участвует в поглощении опинов и агропина 84. Последний ген локуса, *accG*, может кодировать белок, гомологичный туюинозитолмонофосфатазам эукариотического типа (данные авторов). Интактный ген необходим для катаболизма агроцинопинов A+B, но не требуется для поглощения опинов или чувствительности к агроцину 84.

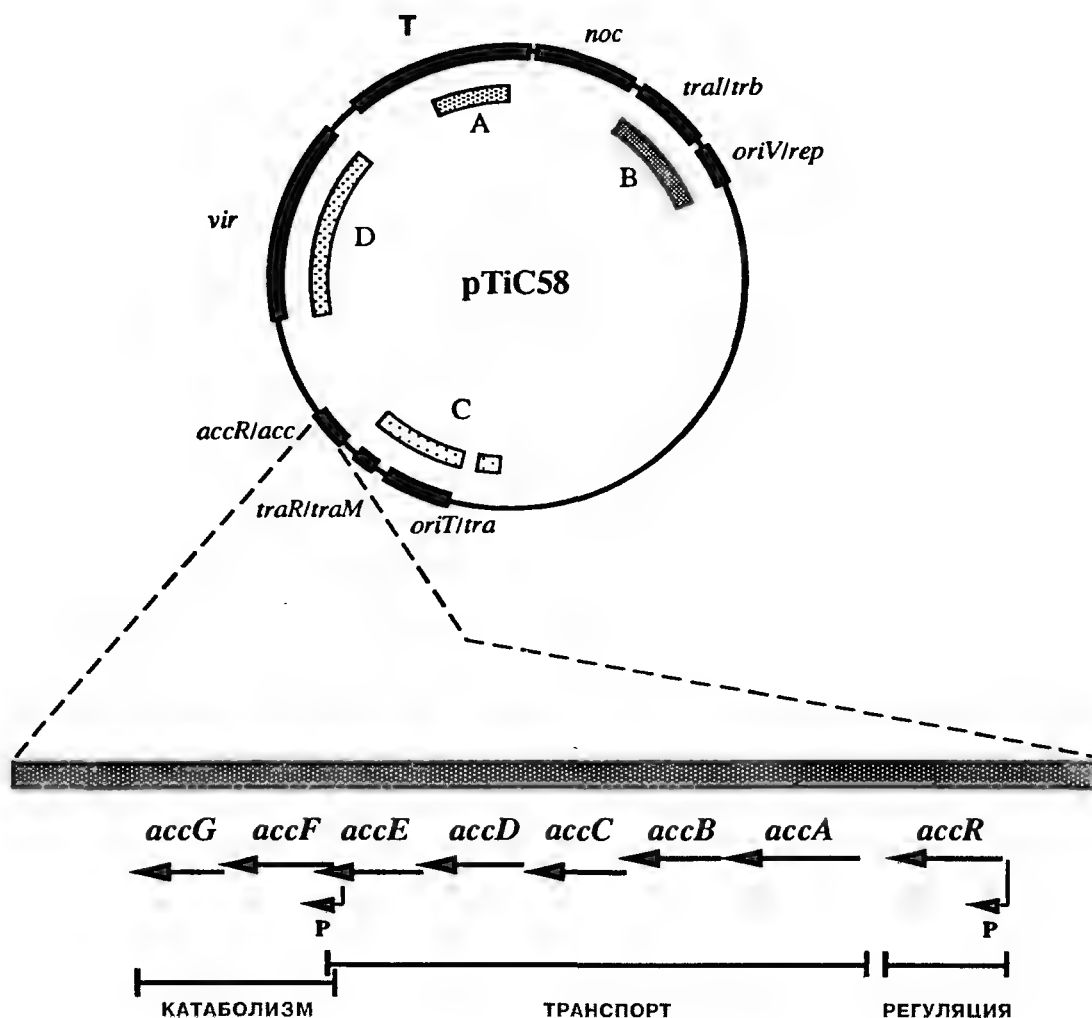


Рисунок 5. Структура локуса *acc*, ответственного за катаболизм агроцинопинов.

Структурная организация плазмиды pTiC58 показана на рис. 2. Регион *acc* увеличен для того, чтобы показать регуляторный ген *accR*, а также гены, участвующие в транспорте и деградации агроцинопина.

Согласно предварительным данным, активность продукта, кодируемого геном *accG*, может быть связана с дефосфорилированием фосфатов сахаров, образующихся из агроцинопинов A+B под действием AccF. Однако неясно, что именно является субстратом, арабиноза-2-фосфат или сахараза (фруктозо-4)-фосфат. Имеется сообщение о том, что белковый продукт гена *accF* родственен продукту гена *avrBS2*, отвечающему за авирулентность *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Swords, 1996). Однако, эти бактерии устойчивы к агроцину 84, даже после предварительной инкубации с агроцинопинами A+B. Каким образом продукт этого гена, или продукт его активности индуцирует реакцию сверхчувствительности у растений, неизвестно.

Оперон *acc* плазмиды pTiC58 экспрессируется на низком, но достаточном для детекции уровне, что обеспечивает чувствительность агробактерий к агроцину 84 даже в отсутствие опинов. Тот факт, что клетки бактерий становятся гиперчувствительными в присутствии агроцинопинов, предполагает, что экспрессия оперона *acc* индуцируется опидами. Правильность этого

Таблица 2. Классификация и характеристика районов агробактериальных плазмид, ответственных за катаболизм агроцинопинов и чувствительность к агроцину 84.

Класс	Плазмида	Признаки		
		Транспорт агроцинопинов	Реакция на агроцин 84	Сходство с областью <i>acc</i> рTiC58
I	pTiC58	+	S ^b	Прототип
	pTiT37	+	S	++ + ^d
	pTiK27	+	S	+++
	pTiJ73	N.D. ^a	S	+++
	pAtK299	N.D.	S	++
II	pArA4a	N.D.	S	+/-
III	pAtK84b	+	R	от - до +/-
N.D.	pTiBo542	-	S ^c	-

^aN.D. — не определяли;

^bS — чувствительны к агроцину 84 без предварительной индукции агроцинопинами A+B, R — устойчив к агроцину 84 даже при предварительной индукции агроцинопинами A+B;

^cpTiBo542 придает чувствительность к агроцину 84 только при предварительной индукции агроцинопинами C+D;

^d++ — очень высокая степень сходства (не наблюдается полиморфизма длины рестрикционных фрагментов), +++ — высокая степень сходства (наблюдается полиморфизм длины фрагментов), +/- — слабое сходство, — нет сходства.

предположения показана с использованием гена-репортера *lacZ* (Haymann, Farrand, 1988). Как сказано выше, первичная регуляция *acc* осуществляется белком AccR, транскрипционным репрессором, кодируемым первым геном оперона (Haymann, Farrand, 1988). Он сходен с классическими репрессорами систем катаболизма других сахаров, включая FucR, DeoR и LacR (Beck von Bodman et al., 1992).

IV.B.3. Другие агроцинопиновые системы.

Пока еще мало известно о системах генов, участвующих в поглощении и катаболизме агроцинопинов C+D, кодируемых Ti-плазмидой штамма Bo542 и *Lippia*-изолятами *A. tumefaciens* (Unger et al., 1985). Как сказано выше, локус плазмиды pTiBo542 придает чувствительность к агроцину 84, но только после индукции агроцинопинами C или D. ДНК-ДНК гибридизация не выявила гомологии между опероном *acc* (катаболизм агроцинопинов A+B) pTiC58 и генами pTiBo542 (Haymann, Farrand, 1990), а значит гены, участвующие в катаболизме этих двух семейств агроцинопинов, различаются. Удивительно, что Ti-плазмиды *Lippia*-типа, содержащие локус катаболизма агроцинопинов C+D, сходны с агроцинопин A+B-катаболизирующей плазмидой pTiC58. Оба типа бактерий чувствительны к агроцину 84 даже в отсутствие опинов, но становятся суперчувствительными при культивировании с агроцинопинами C+D (Unger et al., 1985).

Системы, кодирующие катаболизм агроцинопинов A+B, разделены на три типа (Haymann, Farrand, 1990; табл. 2). Системы первого типа, например, оперон *acc* pTiC58, обеспечивают поглощение и утилизацию агроцинопинов A+B и чувствительность к агроцину 84 даже в отсутствие опинов. Подобные системы обнаружены на нопалиновых Ti-плазмидах разного происхождения, так же как и на нопалин-катаболизирующей плазмиде непатогенного изолята K299 *A. radiobacter*. По результатам ДНК-ДНК гибридизации эти локусы гомологичны, хотя локус на pAtK299 гибридизуется слабее и имеет иной состав фрагментов при использовании оперона *acc* в качестве зонда. Система второго типа, кодируемая опиц-катаболизирующей плазмидой

pAgA4a штамма A4a *A. rhizogenes*, обеспечивает такой же фенотип, что и локусы типа I, но не обнаруживает гомологии при гибридизации с зондом *acc*. Особый интерес представляет система типа III. Локус *acc* обеспечивает поглощение и катаболизм агроцинопинов A+B, но не приводит к чувствительности к агроцину 84 в условиях опыта. Данный локус не обеспечивает поглощение антибиотика, даже при предварительной индукции опиными. Этот локус находится на опин-катаболизирующей плазмидой штамма K84 *A. radiobacter*, который является продуцентом антибиотика.

Приведенные данные удивительны тем, что плазмиды pAtK84b и pTiC58 сходны между собой (Clare et al., 1990). Они содержат локусы *nos*, ответственные за катаболизм нопалина, районы *tra* и *trb*, отвечающие за конъюгативный перенос, и *oriV/rep*, ответственные за репликацию, разделение и стабильность плазмид. Более того, обе плазмиды позволяют утилизировать агроцинопины A+B как конъюгативные опины (глава 10). На основании этих данных можно предположить, что эти плазмиды имеют общее происхождение и дивергировали недавно. Однако, по результатам ДНК-ДНК гибридизации, *acc*-локус pAtK84b слабо гибридизуется с *acc*-локусом pTiC58 (Clare et al., 1990; Haymann, Farrand, 1990). В сочетании с фенотипическими различиями штаммов, связанными с локусами *acc*, можно заключить, что либо они обладают разным происхождением, либо скорость дивергенции для этих локусов намного выше, чем для других локусов изучаемых плазмид.

IV.B.4. Агроцинопины, агроцин 84 и конкуренция за колонизацию корончатых галлов

Штамм K84 обладает двумя удивительными и связанными между собой признаками. Во-первых, сам он не индуцирует образование опухолей, но может катаболизировать опины двух семейств, нопалин и агроцинопины A+B. Этим признаком бактерии обладают благодаря наличию плазмиды pAtK84, родственной pTiC58, классической плазмиде нопалин/агроцинопинового типа. Во-вторых, бактерии синтезируют агроцин 84. Этот антибиотик токсичен для патогенных агробактерий, несущих Ti- или Ri-плазмиды с генами катаболизма агроцинопинов. Поэтому можно предположить, что штамм K84 паразитирует на опухолях, вызываемых патогенными агробактериями. Тот факт, что эта бактерия продуцирует антибиотик, специфический по отношению к патогенам, уже колонизировавшим опухоли, опины которых она способна утилизировать, придает дополнительную элегантность системе. Штамм K84 выработал стратегию замещения первичных патогенов, и действует через систему, которая гарантированно индуцируется у штамма-мишени (Farrand, 1991). Этот феномен суперпаразитизма существенно расширяет представления, заложенные в "опиновой концепции".

IV.C. ЭВОЛЮЦИЯ ФУНКЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ОПИНАМИ

Ключевой особенностью Ti-плазмид является наличие двух наборов генов, один из которых (гены вирулентности, гены катаболизма опинов) экспрессируется в бактерии, а другой (Т-ДНК) — в растении (рис. 2). Как прокариотические и эукариотические функции возникли и эволюционировали в бактерии? Ответ на этот вопрос пока отсутствует. Путем анализа границ Т-ДНК и области вирулентности установлена их гомология генам, вовлеченным в конъюгативный перенос плазмид (Buchanan-Wollaston et al., 1987; Cook, Farrand, 1992; Citovsky et al., 1992; Pansegrau et al., 1993; Shirasu, Kado, 1993; Kado, 1994; Less, Lanka, 1994; Farrand et al., 1996). Это позволяет предположить существование бактериального предка этих двух областей. Кроме того, некоторые гены Т-ДНК обладают гомологией с генами других фитопатогенных бактерий (Powell, Morris, 1986; Yamada et al., 1985; 1986; Morris, 1986; Gaudin et al., 1994). Наличие интрон-подобной последовательности в одном из локусов Т-ДНК *A. rhizogenes*, вовлеченных в корнеобразование, указывает на ее растительное происхождение (Magrelli et al., 1994). Рассмотрение данных о структуре и метаболизме опинов может дать ответы на эволюционные вопросы, поскольку синтез опинов зависит от эукариотических, а катаболизм — от прокариотических генов.

IV.C.1 Плазмиды маннитилопинового и аматориопинового типа: почвенное происхождение?

Маннитилловые опины (агропин, маннопин, маннопиновая и агропиновая кислоты; рис. 1) привлекли особое внимание потому, что они широко распространены в корончатых галлах и бородачатых корнях (Dessaux et al., 1992), а также потому что клетки корончатых галлов синтезируют их в больших количествах (до 7% сухого вещества; Tate et al., 1982). Гены, кодирующие деградацию этих опинов, активно изучались для Ti-плазмиды 15955 октопинового типа (190 т.п.н.), на которой они занимают около 40 т.п.н. (рис. 2) (Dessaux et al., 1987, 1988; Farrand et al., 1990). Выявление регуляторных мутантов на средах с синтетическими аналогами маннитола позволяет предположить регуляцию деградации маннитилловых производных опином (Chilton, Chilton, 1984). Механизм регуляции является сложным, для маннопиновой и агропиновой кислот показана перекрестная индукция и множественная регуляция катаболической активности. Сходным образом маннопин и агропин индуцируют деградацию всех четырех маннитилловых опинов (Dessaux et al., 1988; Hong et al., 1993). Более того, если маннопин не является единственным источником азота, для его деградации характерна катаболитная репрессия, например, сукцинатом (Nautiyal et al., 1992; Hong et al., 1993).

При катаболизме маннопиновой кислоты, в случае его индукции самой кислотой, происходит деградация опиона до маннозы (и, возможно, глутамата), а сахарный остаток изомеризуется до фруктозы (Dessaux et al., 1988). Существует и второй путь катаболизма маннопиновой кислоты: возможно, он основан на работе ферментов, участвующих в деградации маннопина (Dessaux et al., 1988; Hong et al., 1993). Этот опион разлагается до дезокси-фруктозил-глутамин (ДФГ) (Kim et al., 1996) - молекулы, которая может превращаться в маннозу или фруктозу (или их производные) и глутамин. Интересно, что маннопин также превращается в агропин как бактериями, так и их бесклеточными экстрактами и наоборот (Dessaux et al., 1986a), эта реакция происходит в клетках корончатых галлов (Ellis et al., 1984; Salomon et al., 1984). Лактонизация маннопина в агропин была сначала соотнесена с активностью *ags*, гена Т-ДНК, ответственного за синтез агропина в опухолях. Позднее эта гипотеза была отвергнута, так как инсерционный мутант по гену *ags* сохранил способность превращать маннопин в лактон агропин (Hong et al., 1997). Дальнейший генетический анализ показал, что агропин-маннопин-лактоназа или маннопин-циклаза является единственным ферментом, необходимым для деградации агропина, подтверждая тот факт, что бактерии могут транспортировать агропин и деградировать маннопин (Hong, Farrand, 1994). Эти данные показывают, что деградация агропина идет через образование маннопина и ДФГ. Сильным контрастом на фоне большого количества данных по деградации агропина, маннопина и маннопиновой кислоты выглядит полное отсутствие таковых по деградации агропиновой кислоты, хотя результаты недавних исследований позволяют предположить, что ее катаболизм также может проходить через образование ДФГ.

Район плазмиды размером 21 т.п.н., ответственный за деградацию маннопина и агропина, клонирован (Dessaux et al., 1987) и частично секвенирован (Kim, Farrand, 1996; Kim et al., 1996), получены мутанты по этому району (Hong et al., 1993; рис. 6). Первый его участок отвечает за транспорт маннопина и агропина, а второй - за их деградацию. В этом районе идентифицированы две рамки считывания, *mosA* и *mosB* (они не идентичны *mos*-генам ризопиновой системы *Rhizobium*). Они гомологичны генам, кодирующим 6-фосфогексодегидрогеназу и дегидратазу, соответственно, но их участие в деградации маннопина или ДФГ не показано. Однако в локусе катаболизма маннопина/агропина присутствует ген *mosE*, продукт которого обладает киназной активностью и, возможно, участвует в фосфорилировании сахаров. *mosR*, по-видимому, является одним из регуляторов экспрессии других катаболитных генов, так как напоминает ген репрессора деградации агропина, обнаруженный на Ri-плазмиде (Kim, Farrand, 1996). Удивительно, что гены, контролирующие синтез маннопина и агропина, в высокой степени гомологичны генам деградации этих опинов, например, локус, кодирующий бактериальную конверсию маннопина в агропин (*mosF* или *agsA*) на 70% гомологичен на уровне ДНК открытой рамке считывания гена *ags*. Эти результаты дают основание предположить, что ген, экспрессирующийся в эукариотической

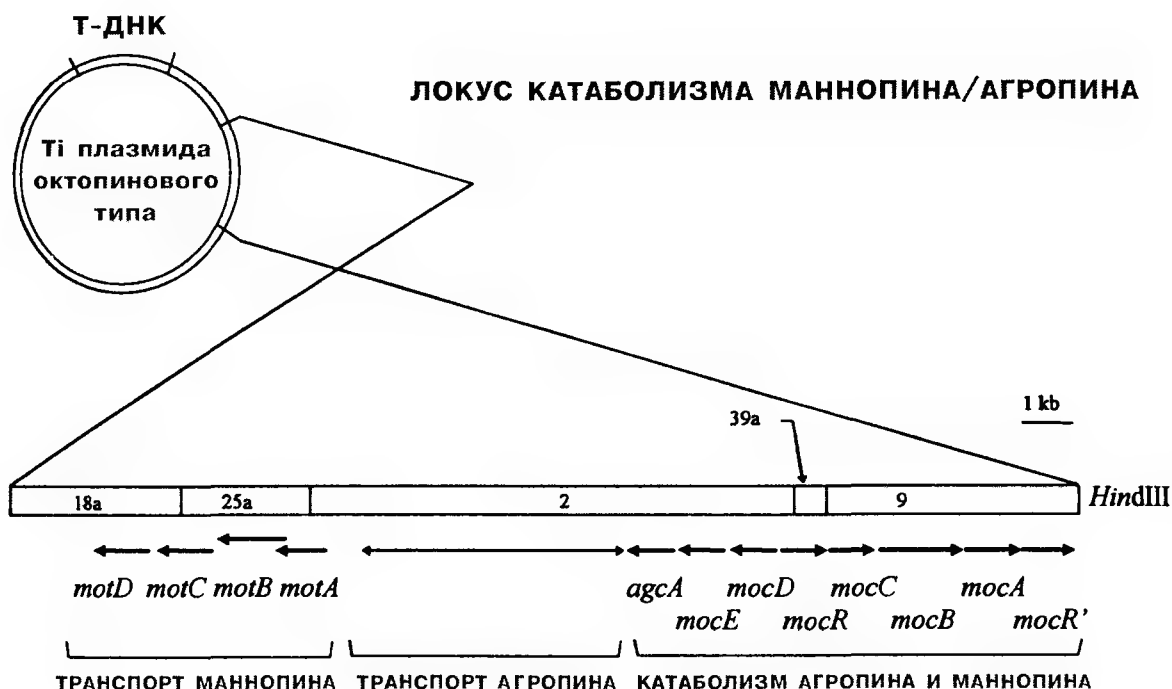


Рисунок 6. Структура области октопиновой Ti-плазмиды, ответственной за катаболизм маннопина/агропина. Построена по данным литературы (Hong et al., 1993; Kim, Farrand, 1996; Kim et al., 1996). Рестрикционная карта октопиновых плазмид приведена по: De Vos et al., 1981.

клетке (*ags*) и ген, экспрессирующийся в бактериальной клетке (*agcA*), произошли от одного предкового гена (Hong et al., 1997). Сходное исследование показало, что гены *mocC* и *mocD*, ответственные за конверсию маннопина вДФГ (*mocC*) и деградациюДФГ (*mocD*), обладают заметной гомологией с генами Т-ДНК *mas1* и *mas2*, контролирующими синтез маннопина иДФГ, соответственно. Удивительно, что 3'-концевой участок гена *mas2* гомологичен части киназного гена *mocE* (Kim, Farrand, 1996; Kim et al., 1996). Таким образом, и в этом случае, эу- и прокариотические гены могут иметь общее происхождение.

Большой интерес представляет происхождение предкового гена, ответственного за катаболизм опинов. Недавно обнаружен новый класс опинов, аматориопины, специфически синтезируемый опухольями, возникающими на *Ficus* и *Chrysanthemum* в результате заражения новым классом штаммов *Agrobacterium* (Bush, Pueppke, 1991; Kovacs, Pueppke, 1994; Bouzar et al., 1995; Vaudequin-Dransart et al., 1995; Chilton et al., 1995). Одним из трех опинов, принадлежащих к этому классу, являетсяДФГ (рис. 1). Двумя другими являются хризопин - лактонДФГ, напоминающий агропин, и деоксифруктоилоксoproлин (ДФОП), а также лактамДФГ, напоминающий агропиновую кислоту (Chilton et al., 1995). Интересно, что помимо октопина, обнаруженного в мышцах различных видов *Octopus* (см. ниже),ДФГ является единственным природным опином, широко встречающимся вне корончатых галлов, так как он спонтанно появляется в большинстве (если не во всех) разлагающихся растительных тканях (Anet, 1957; Anet, Reynolds, 1957; Heyns, Paulsen, 1959). Растительные остатки часто находятся в контакте с почвой - природным местом обитания агробактерий. Это могло оказать селективное давление в пользу закрепления у агробактерий генов катаболизмаДФГ, даже до появления Ti-плазмид (Vaudequin-Dransart et al., 1995). Эта гипотеза получила серьезное подтверждение, так как большинство протестированных патогенных и непатогенных агробактерий способно деградироватьДФГ, что указывает на наличие

у агробактерий соответствующих генов вне Ti-плазмид. Судя по последним данным, эти гены локализованы на криптической плазмиде. Таким образом, ДФГ мог быть исходным опином, на основе которого в ходе эволюции появились другие опины. Приведенные ранее данные о том, что ДФГ является промежуточным метаболитом при синтезе и деградации маннитоловых опинов (Ellis et al., 1984; Salomon et al., 1984) и амадориопинов, подтверждают эту гипотезу.

Модель, объясняющая эволюцию Ti-плазмид, пока спекулятивна (Dessaux et al., 1992; Vaudequin-Dransart et al., 1995). Она предсказывает, что исходные плазмиды, катаболизирующие ДФГ, приобрели функции, позволяющие бактериям конвертировать этот широко встречающийся опин в маннопин и агропин – субстраты, менее доступные конкурирующим почвенным микроорганизмам. В то же время или позднее, гены, ответственные за конверсию ДФГ в маннопин и агропин, могли дублироваться и войти в состав “прото-Т-ДНК”. Интересно, что эволюция систем катаболизма и анаболизма агроцинопинов также строится на дубликации – стратегии, впервые показанной для маннитоловых опинов. Так, продукт ранее упомянутого гена *accF*, участвующий в катаболизме агроцинопинов А и В, гомологичен продукту *acs* – гена агропинсинтазы, локализованного в Т-ДНК Ti-плазмид нопалин/агроцинопинового типа (данные авторов). Безотносительно верности этой модели, исследования по метаболизму опинов являются элегантным способом решения загадки возникновения Ti- и Ri-плазмид. Данные, приведенные в этом разделе, поддерживают характеристику Ti- и Ri-плазмид как преимущественно катаболических репликонов.

IV.C.2. Ti-плазмиды нопалинового и октопинового типа: морское происхождение?

Как сказано выше, среди опинов нопалин и октопин были открыты одними из первых. Октопин оказался индуктором переноса октопиновых Ti-плазмид (тогда как нопалин не обладает подобным действием) и ценным питательным субстратом для *Agrobacterium* (Kerr et al., 1977; Klapwijk et al., 1978; Petit et al., 1978a, 1978b; Tempé et al., 1978; Ellis et al., 1982a; 1982b). Деградация октопина и индукция переноса Ti-плазмиды индуцируется и регулируется октопином и родственными опинами (лизопин, октопиновая кислота), что было подтверждено при изучении регуляторных мутантов, отобранных на различных неиндуцирующих аналогах опинов, таких как нороктопин или гистопин (Klapwijk et al., 1976; Montoya et al., 1977; Petit, Tempé, 1978; Petit et al., 1978a; Tempé et al., 1978; Klapwijk, Schilperoort, 1979). Обнаружены три класса мутантов: с конститутивной деградацией опинов, с конститутивным конъюгативным переносом плазмиды, с конститутивным протеканием обоих процессов (Klapwijk et al., 1978; Tempé et al., 1978).

При анализе катаболизма октопина и лизопина оказалось, что они расщепляются до составляющих: пирувата и аргинина или лизина, соответственно (Jubier, 1972; Bomhoff, 1976). Аргинин деградирует до орнитина, который затем превращается в пролин, катаболизм которого осуществляется в два этапа, через дельта-1-пирролин-5-карбоксилат (П5К) и глутамат (Dessaux et al., 1986b; Farrand, Dessaux, 1986; Sans et al., 1987; Cho et al., 1996). Конверсия орнитина в пролин происходит под действием фермента орнитинциклодезаминазы (ОЦДазы). *Agrobacterium* является первой грам-отрицательной бактерией, у которой этот фермент обнаружен (Dessaux et al., 1986b; Sans et al., 1987). ОЦДаза обладает высокой гомологией с белком Nfe *Rhizobium meliloti*, участвующим в клубенькообразовании (Soto et al., 1994). Еще более удивительно то, что основной компонент глазных хрусталиков австралийских сумчатых m-кристаллин гомологичен этому необычному ферменту *Agrobacterium*. Поскольку активность ОЦДазы приводит к образованию пролина, считающегося осмопротектором, m-кристаллин может обладать сходной биологической функцией для поддержания прозрачности хрусталика в условиях водного стресса (Kim et al., 1992).

Как показано на рисунке 7, гены, отвечающие за катаболизм октопина, сгруппированы в два противоположно транскрибируемых регулона (Schröder et al., 1990). Первый содержит регуляторный ген *occR* (Von Linting et al., 1991; Habeeb et al., 1991), принадлежащий к семейству *lysR*-генов, также контролирующим конъюгативный перенос плазмид (Klapwijk et al., 1978; Tempé et al., 1978). OccR негативно регулирует собственную транскрипцию (независимо от присутствия октопина) и в присутствии октопина позитивно регулирует транскрипцию катаболитных генов, собранных во втором опероне (Wang et al., 1992; Von Lintig et al., 1994). Эти гены отвечают за транспорт октопина (*occQ*, *occM*, *occJ/T*, *occP*) (Valdivia et al., 1991; Zanker et al., 1992). OccJ/T,



Рисунок 7. Области катаболизма октопина (*ocs*) и нопалина (*noc*) октопиновой Тi-плазмиды.

Цитируется по: Zanker et al., 1992. Рестрикционные карты приведены по: De Vos et al., 1981 для октопиновой плазмиды, и по: Zanker et al., 1992 для нопалиновой плазмиды. Обозначения: *ocd*, орнитинциклодеаминаза; *oox*, октопиноксидаза; *ocs*, катаболизм октопина; *40k*, открытая рамка считывания, кодирующая белок 40 кДа неизвестной функции; *arc*, катаболизм аргинина (аргиназа); *nox*, нопалиноксидаза; *noc*, катаболизм нопалина.

возможно, является октопин-связывающим периплазматическим белком, тогда как остальные три белка являются мембранными транспортными белками. Гены *ocs* сходны с генами, кодирующими различные компоненты систем транспорта аминокислот, такие как *HisP* (гистидинпермеаза), *HisM* и *HisQ* (два мембранных белка), *HisJ* и *ArgT* (гистидин- и аргинин-связывающие периплазматические белки) (Valdivia et al., 1991; Zanker et al., 1992). Интересно, что нопалин является производным аргинина, а гистопин — производным гистидина (Kemp, 1977).

Следом за генами транспортной системы расположены гены *ooxB* и *ooxA*, кодирующие октопиноксидазу, превращающую октопин в аргинин (Zanker et al., 1992). Последним геном в опероне является *ocd* (Schindler et al., 1989); он кодирует ОЦДазу, о которой говорилось выше. Гены, кодирующие аргиназу и Ф5К-дегидрогеназу, расположены вне октопиновой Тi-плазмиды (Dessaux et al., 1986b). Район, ответственный за деградацию нопалина, гомологичен району, ответственному за деградацию октопина, но организован иначе (Schröder et al., 1990; Zanker et al., 1994; рис. 7). Гены, отвечающие за транспорт нопалина (*nocP*, *nocJ/T*, *nocQ* и *nocM*) по-разному транскрибируются с промотора, который также контролирует транскрипцию регуляторного гена *nocR* (Von Lintig et al., 1994). Интересно, что гены, кодирующие ферменты катаболизма, расположены следом за генами, отвечающими за поглощение нопалина и транскрибируемыми с другого опин-индуцируемого промотора (Zanker et al., 1992; Von Lintig et al., 1994).

В дополнение к *noxB* и *noxA* (кодируют нопалиноксидазу) и между генами *noxA* и *ocd* (ОЦД-аза) расположены два гена, специфических для области катаболизма нопалина: *arc*, кодирующий

аргиназу, и *40k*, открытая рамка считывания с неизвестной функцией, кодирующая белок с молекулярной массой 40 кДа (Sans et al., 1987, 1988; Schell et al., 1989). За исключением этих двух генов, остальные гены поглощения и катаболизма нопалина родственны октопиновым, что предполагает их общее происхождение (Schindler et al., 1989; Zanker et al., 1992, 1994). У большинства октопиновых и нопалиновых штаммов (за исключением C58) в геноме имеется дополнительная копия гена *ocd*, позволяющая бактериям расти на аргинине как единственном источнике углерода (Dessaux et al., 1986b; Cho et al., 1996). У бактерий, лишенных дополнительной копии этого гена (C58), на среде с аргинином можно отбирать мутантов с конститутивной деградацией нопалина или октопина. Сходным образом, октопин не является индуктором поглощения и деградации нопалина (Petit, Tempé, 1975, 1978; Klapwijk et al., 1977; Petit et al., 1978b).

Хотя гены, участвующие в синтезе ДФГ, маннопина и агропина, гомологичны своим катаболическим партнерам, сходного явления для генов катаболизма октопина и нопалина не обнаружено. Они образуются в клетках корончатых галлов с помощью ферментов октопинсинтазы и нопалинсинтазы, которые не обладают гомологией с катаболическими оксидазами. На уровне нуклеотидных последовательностей гены *ocs* и *nos*, кодирующие синтез октопина и нопалина, сходны с генами *oos* и *nox*, но неродственны им (Zanker et al., 1994). Происхождение генов синтеза и катаболизма этих опинов неизвестно.

Хотя гены катаболизма опинов обнаружены у других представителей Rhizobiaceae (Bergeron et al., 1993), некоторые данные говорят о возможном "морском" происхождении метаболизма октопина и нопалина. Во-первых, октопин изначально был обнаружен у *Octopus* spp. как производное аргинина, образующееся при анаэробной работе мышц (Thoai, Robin, 1959). Это же соединение позднее было выявлено и у других морских животных, таких как головоногие и двусторчатые моллюски (Tempé, 1983). У некоторых из них быстрое движение требует высоких концентраций АТФ, которые поддерживаются анаэробным гликолизом и переносом фосфата от фосфоаргинина к АДФ, ведущими к накоплению НАДФ и аргинина (Grieshaber, Gäde, 1976). Биологическая роль октопинсинтазы (также называемой октопиндегидрогеназой) состоит в присоединении аргинина к пирувату, эта реакция требует окисления НАДФ и снижает уровень НАДФ и аргинина в мышечных клетках. Таким образом, реакция гарантирует постоянный уровень гликолиза и регенерации АТФ из фосфоаргинина, а значит и высокую мышечную активность животного в течение долгого времени (Zammit, Newsholme, 1976). С эволюционной точки зрения, замечательным выглядит недавнее обнаружение морских штаммов *Agrobacterium* в донных отложениях северо-восточных районов Атлантического океана (Ruger, Hofle, 1992). Сходство этих микробов с агробактериями доказано данными фенотипического и молекулярного анализа (гомология ДНК/ДНК, состав ДНК, анализ генов 5S рРНК и тРНК). Хотя способность к катаболизму опинов у этих штаммов не изучалась, логично предположить, что некоторые из них могут использовать октопин, что согласуется с данными о наличии октопина в окружающей среде (Tempé, 1983) и об обнаружении опинов-деградирующих морских бактерий в моллюсках (Dion, 1986).

V. Опины как ключевые факторы в растительно-агробактериальном взаимодействии

Из изложенных фактов ясна роль опинов во взаимодействии растений с агробактериями: опины являются питательными субстратами для патогенов и способствуют их распространению. Экологические исследования по синтезу опинов в растениях и их утилизации бактериями дали экспериментальное подтверждение этой теории. Первый значимый результат был получен при сравнении роста двух изогенных штаммов *Pseudomonas putida*, один из которых является природным потребителем маннопина, а второй – его инсерционным мутантом, неспособным к деградации опинов. В ризосфере трансгенных растений, синтезирующих маннопин, природный штамм обладал селективным преимуществом (Lam et al., 1991; Lam, Gaffney, 1993). Сходные опыты были проведены с растениями *Lotus corniculatus*, способными или неспособными к синтезу опинов в условиях гидропонной культуры. Совместное заражение ризосферы растений штаммами агробактерий, способными и неспособными к утилизации опинов, показало, что синтез растениями маннопина, маннопиновой кислоты и агропиновой кислоты специфически и существенно способ-

ствовал росту опин-утилизирующих бактерий (Guyon et al., 1993). В сходном опыте показано, что агропин-утилизирующий штамм *Pseudomonas fluorescens* обладает селективным преимуществом при сравнении со штаммом, неспособным к деградации агропина, при заражении ризосферы трансформированных растений табака, синтезирующих агропин (Savka, Farrand, 1997). Эти опыты дают прямые подтверждения правильности опиновой концепции, подтверждая теорию, долгое время считавшуюся гипотезой.

Однако не все данные о биологической роли опинов можно считать объясненными. Например, некоторые из этих соединений усиливают экспрессию генов вирулентности *Agrobacterium* в присутствии ацетосирингона. Эффект опосредован работой генов *virA* и *virG*, продукты которых реагируют на наличие фенольных индукторов (VirA) и вызывают экспрессию (VirG) других генов вирулентности (Veluthambi et al., 1989). Это согласуется с данными о том, что опины поглощаются штаммами, не содержащими Ti-плазмиду (Krishnan et al., 1991), и о том, что криптическая плазида агробактерий участвует в деградации ДФГ и способствует утилизации октопина как единственного источника азота. Интересно, что при ограничении содержания октопина в условиях хемостата бактерии наиболее активно используют октопин в качестве источника азота, а не углерода (Bell, 1990).

Недавние работы позволили внести уточнения в опиновую концепцию и более точно определить роль опинов в растительно-бактериальном взаимодействии. Например, хемотаксис по отношению к опинам подтверждает их сигнальную роль на разных этапах взаимодействия. Примеры с агроцинопинами и агроцином 84 говорят об участии опинов в контроле межбактериальных взаимодействий в опухолевых тканях. И, наконец, данные по биосинтезу и катаболизму опинов подтверждают, что они являются не только ключевыми молекулами взаимодействия (что отражено в опиновой концепции), но, возможно, сыграли значительную роль в эволюции Ti- и Ri-плазмид.

VI. Куда ведет «опиновый след»?

В статье “Опиновый след” (Petit, Tempé, 1983) был задан вопрос “Куда ведет опиновый след?” Уже тогда авторы указывали на необходимость использования экологических подходов для подтверждения опиновой концепции. Спустя почти 15 лет призыв был услышан. По данным, приведенным выше, именно экология стала одной из основных “территорий”, к которой привел опиновый след. Это утверждение в скором времени получит большее экспериментальное подтверждение, так как уже проводятся многочисленные тесты с применением трансгенных растений, синтезирующих опины, и ассоциированных с ними бактерий. Интересно, что большинство этих исследований направлено на оценку возможности создания растительно-бактериальных ассоциаций на базе опиновой зависимости. Так как правильность опиновой концепции доказана, логично предположить, что синтез растениями опинов будет способствовать росту доли опин-утилизирующих бактерий в ризосфере, следовательно, любого опин-утилизирующего штамма, внесенного человеком (Dessaux et al., 1987; Guyon et al., 1993; Farrand et al., 1994; Wilson, Lindow, 1994; Rossbach et al., 1994b; Wilson et al., 1995; O’Connell et al., 1996). Если же эти бактерии будут обладать признаком, выгодным для растения (например, контролировать заражение), то созданная ассоциация может преобразоваться в “искусственный симбиоз” (Dessaux et al., 1992), в котором микроорганизм защищает растение, которое его питает.

Хотя до “искусственного симбиоза” еще предстоит пройти долгий путь, уже получены два замечательных результата. Во-первых, придание *Pseudomonas syringae* способности к деградации опинов повышает активность колонизации поверхности листьев трансгенного табака, синтезирующего опины (Wilson et al., 1995). Во-вторых, в условиях, близких к полевым, показано, что рост маннопин-утилизирующих бактерий значительно усиливается в ризосфере маннопин-синтезирующего генотипа *Lotus corniculatus* (Oger et al., 1997). Далее это явление наблюдали для нопалин- и сукцинамопин-синтезирующих растений *L. corniculatus* и нопалин- и сукцинамопин-утилизирующих микробов. Все это подтверждает, что способность растения синтезировать опины может быть элегантным способом специфического поддержания роста опин-деградирующих бактерий. Эта стра-

тегия получила несколько названий: "искусственный симбиоз" (Dessaux et al., 1992), "искусственное разделение пищевых ресурсов" (Wilson, Lindow, 1994), "искусственная ризосфера" (Rossbach et al., 1994b). Существует общее мнение о том, что изучение ризосферы, представляющей "практически неисследованный рубеж геномной инженерии" (O'Connell et al., 1996), несомненно, выиграет от использования опинов.

В статье "Опиновый след" была подчеркнута важность дальнейшего изучения роли опинов в растительно-ризобиальном взаимодействии (Petit, Tempé, 1983). И здесь ученые последовали призыву. Чтобы убедиться в этом, достаточно оценить количество данных по ризопинам клубеньков, рассмотренных в этом обзоре. Параллельно с изучением ризопинов, накапливаются данные о различных соединениях, синтезируемых растением и специфически деградируемых бактериями рода *Rhizobium*. Примерами такого рода являются калистегины (Terfer et al., 1988a). Эти полигидроксикалоиды обладают свойством ингибировать гликозидазы (Molyneux et al., 1993), они обнаружены в больших количествах в корнях и эксудатах узкого круга видов растений, таких как *Calystegium sepium*, *Convolvulus arvensis* и *Atropa belladonna* (Terfer et al., 1988b). Интересно, что штамм Rm41 *Sinorhizobium meliloti* является единственным изолятом, способным деградировать эти соединения, именно это свойство может объяснить наличие этого штамма в ризосфере *Calystegium* - растения, не являющегося хозяйским при азотфиксирующем симбиозе (Terfer et al., 1988a, 1988b; Boivin et al., 1990b).

Мимозин является токсической аминокислотой, синтезируемой в больших количествах корнями, листьями и семенами *Mimosa* и *Leucaena*. Штаммы *Rhizobium*, вступающие в симбиоз с *Leucaena*, используют мимозин в качестве единственного источника N и C, а другие ризобии этой способностью не обладают (Soedarjo et al., 1994). По биологическому значению утилизация мимозина напоминает утилизацию ризопинов (хотя последние синтезируются бактероидами), например, оба типа соединений способствуют отбору специфичных популяций клубенькообразующих бактерий. Сходное наблюдение сделано для штаммов *A. vitis*, способных деградировать тартрат, активно синтезируемый хозяйским растением *Vitis vinifera* (Crouzet, Otten, 1995).

И наконец, остается повторить вопрос: обнаруживаются ли опин-подобные молекулы где-либо помимо растительно-ризобиальных взаимодействий? Пока получено лишь ограниченное количество негативных данных. Однако, недавнее изучение фасциации - болезни, вызываемой грамположительной бактерией *Rhodococcus fasciens*, пролило свет на эту проблему. С использованием теста на дифференциальный рост, изначально разработанного для определения опинов в опухолях, индуцированных агробактериями, обнаружено, что образующиеся галлы содержат особые соединения, которые штаммоспецифично деградируются *Rhodococcus*. Структура этих соединений пока неизвестна, и еще предстоит выяснить, являются ли они опинами.

Сходные взаимодействия могут быть характерны и для некоторых бактериальных симбионтов животных. Например, *Bacteroides thaitaotomicron* способна деградировать хондроин-сульфат, гепарин и другие мукополисахариды, что может иметь значение при колонизации внеклеточного матрикса гастроэнтерального тракта млекопитающих (Hwa, Salyers, 1992; Cheng et al., 1992). *Salmonella typhimurium* обладает высокой активностью сиалидазы, которая расщепляет сиалогликоконъюгаты, в избытке находящиеся в кишечнике млекопитающих (Vimr, 1994). Логично предположить, что способность бактерий к специфическому катаболизму метаболитов хозяина (ключевое положение опиновой концепции) применима не только к растительно-бактериальным взаимодействиям, но и к другим системам, состоящим из двух взаимодействующих организмов (паразитизм, симбиоз, комменсальный рост), в которых она может контролировать, по крайней мере частично, взаимное узнавание и адаптацию.

VII. Благодарности

Авторы благодарны Козну Геталсу за представление неопубликованных данных по *Rhodococcus fasciens*, Паскалю Леро за помощь в сборе литературных ссылок и Натали Дженсон (ISV-CNRS) за оформление.

VIII. Литература

- Anet E.F.L.J. (1957). *Austral. J. Chem.* V. 10, p. 193-197.
- Anet E.F.L.J., Reynolds T.M. (1957). *Austral. J. Chem.* V. 10, p. 182-192.
- Ashby A.M., Watson M.D., Loake G.J., Shaw C.H. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 4181-4187.
- Barker R.F., Idler K.B., Thompson D.V., Kemp J.D. (1983) *Plant Mol. Biol.* V. 2, p. 335-350.
- Beauchamp C.J., Chilton W.S., Dion P., Antoun H. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 56, p. 150-155.
- Beck von Bodman S., Hayman G.T., Farrand S.K. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 89, p. 643-647.
- Bell C.R. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 56, p. 1775-1781.
- Bergeron J., Beaulieu C., Levesque R., Kondorosi A., Dion P. (1993) *Can. J. Microbiol.* V. 39, p. 1041-1050.
- Better M., Lewis B., Corbin D., Ditta G., Helinski D.R. (1983) *Cell.* V. 35, p. 479-485.
- Biemann K., Lioret C., Asselineau J., Lederer E., Polonski J. (1960) *Bull. Soc. Chi. Biol.* V. 42, p. 979-991.
- Birou A.M., Bouchez D., Casse-Delbart F., Durand-Tardiff M., Jouanin L., Pautot V., Robaglia C., Tepfer D., Tepfer M., Toumeur J., Vilaine F. (1987) *Plant Physiol. Biochem.* V. 25, p. 323-355.
- Boivin C., Camut S., Malpica C.A., Truchet G., Rosenberg C. (1990a) *The Plant Cell.* V. 2, p. 1157-1170.
- Boivin C., Malpica C., Rosenberg C., Goldmann A., Fleury V., Maille M., Message B., Pamboukdjian N., Tepfer D. (1990b) *Symbiosis.* V. 9, p. 147-154.
- Bomhoff G. (1976) Studies on crown-gall - a plant tumor. Ph.D. Thesis, University of Leiden, The Netherlands.
- Bomhoff G.H., Klapwijk P.M., Kester H.C., Schilperoort R.A., Hernalsteens J.P., Schell J. (1976) *Mol. Gen. Genet.* V. 145, p. 188-181.
- Bouzar H., Chilton W.S., Nesme X., Dessaux Y., Vaudequin V., Petit A., Jones J.B., Hodge N.C. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 61, p. 65-73.
- Braun A.C. (1947) *Amer. J. Bot.* V. 34, p. 234-240.
- Braun A.C. (1982) In: Kahl G., Schell J. (eds.) *Molecular biology of plant tumors*, p. 155-210. Academic Press, San Diego.
- Buchanan-Wollaston V., Passiatore J.E., Cannon F. (1987) *Nature.* V. 328, p. 172-175.
- Bush A., Pueppke S.G. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 57, p. 2468-2472.
- Cheng Q., Hwa V., Salyers A.A. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 7185-7193.
- Chilton M.D., Drummond M.H., Merlo D.J., Sciaky D., Montoya A.L., Gordon M.P., Nester E.W. (1977) *Cell.* V. 11, p. 263-271.
- Chilton M.D., Tepfer D.A., Petit A., David C., Casse-Delbart F., Tempe J. (1982) *Nature.* V. 295, p. 432-434.
- Chilton W.S., Chilton M.D. (1984) *J. Bacteriol.* V. 158, p. 650-658.
- Chilton W.S., Rinehart Jr. K.L., Chilton M.D. (1984a) *Biochemistry.* V. 23, p. 3290-3297.
- Chilton W.S., Stomp A.M., Beringue V., Bouzar H., Vaudequin-Dransart V., Petit A., Dessaux Y. (1995) *Phytochemistry.* V. 40, p. 619-628.
- Chilton W.S., Tempe J., Matzke M., Chilton M.D. (1984b) *J. Bacteriol.* V. 157, p. 357-362.
- Cho K., Fuqua C., Martin B.S., Winans S.C. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 1872-1880.
- Citovsky V., Gail McLean B., Greene E., Howard E., Kuldau G., Thorntenson Y., Zupan J., Zambryski P. (1992) In: Verma D.P.S. (ed.) *Molecular signals in plant-microbe communications*, p. 169-199. CRC Press, Boca Raton.
- Clare B.G., Kerr A., Jones D.A. (1990) *Plasmid.* V. 23, p. 126-137.
- Cook D.M., Farrand S.K. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 6238-6246.
- Crouzet P., Otten L. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 6518-6526.
- Davidou E., Petit A., Tate M.E., Ryder M.H., Tempe J. (1988) *Phytochemistry.* V. 27, p. 2429-2433.
- De Beuckeleer M., De Block M., De Greve H., Depicker A., De Vos R., De Vos G., De Wilde M., Dhaese P., Dobbelaere M.R., Engler G., Genetello C., Hernalsteens J.P., Holsters M., Jacobs A., Schell J., Seurinck J., Silva B., Van Haute E., Van Montagu M., Van Vliet F., Villaroel R., Zaenen I. (1978) In: Ride M. (ed.) *Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria*, p. 115-126. INRA, Angers.
- Depicker A., De Wilde M., De Vos G., Van Vliet F., De Brock M., Villaroel R., Van Montagu M., Schell J. (1980) *Plasmid.* V. 3, p. 192-211.
- Dessaux Y., Guyon P., Farrand S.K., Petit A., Tempe J. (1986a) *J. Gen. Microbiol.* V. 132, p. 2549-2559.
- Dessaux Y., Guyon P., Petit A., Tempe J., Demarez M., Legrain C., Tate M.E., Farrand S.K. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 2939-2946.
- Dessaux Y., Petit A., Tempe J. (1992) In: Verma D.P.S. (ed.) *Molecular signals in plant-microbe communications*, p. 109-136. CRC Press, Boca Raton.
- Dessaux Y., Petit A., Tempe J. (1993) *Phytochemistry.* V. 34, p. 31-38.
- Dessaux Y., Petit A., Tempe J., Demarez M., Legrain C., Wiame J.M. (1986b) *J. Bacteriol.* V. 166, p. 44-50.
- Dessaux Y., Tempe J., Farrand S.K. (1987) *Mol. Gen. Genet.* V. 208, p. 301-308.
- De Vos G., De Beuckeleer M., Van Montagu M., Schell J. (1981) *Plasmid.* V. 6, p. 249-253.
- Dilworth M.J., Glenn A. (1984) *Trends Biochem. Sci.* V. 9, p. 519-523.
- Dion P. (1986) *Can. J. Microbiol.* V. 32, p. 959-963.
- Ditta G., Virts E., Palomares A.J., Kim C.H. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 3217-3223.
- Drummond M.H., Gordon M.P., Nester E.W., Chilton M.D. (1977) *Nature.* V. 269, p. 535-536.
- Ellis J.G., Murphy P.J. (1981) *Mol. Gen. Genet.* V. 181, p. 36-43.
- Ellis J.G., Murphy P.J., Kerr A. (1982a) *Mol. Gen. Genet.* V. 186, p. 275-281.

- Ellis J.G., Kerr A., Petit A., Tempe J. (1982b) *Mol. Gen. Genet.* V. 186, p. 269-274.
- Ellis J.G., Ryder M.H., Tate M.E. (1984) *Mol. Gen. Genet.* V. 195, p. 466-473.
- Farrand S.K. (1991) In: Pimentel D. (eds) *Pest management handbook*, Vol. 2, p. 311-329. CRC Press, Boca Raton.
- Farrand S.K., Dessaux Y. (1986) *J. Bacteriol.* V. 167, p. 732-734.
- Farrand S.K., Hwang I., Cook D.M. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 4233-4247.
- Farrand S.K., Tempe J., Dessaux Y. (1990) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 3, p. 259-267.
- Farrand S.K., Wilson M., Lindow S.E., Savka M.A. (1994) In: Ryder M.H., Stephens P.M., Bowen G.D. (eds.) *Improving plant productivity with rhizosphere bacteria*, CSIRO, Glen Osmond.
- Firmin J.L., Fenwick R.G. (1978) *Nature.* V. 276, p. 842-844.
- Gaudin V., Vrain T., Jouanin L. (1994) *Plant Physiol. Biochem.* V. 32, p. 11-29.
- Gielen J., De Beuckeleer M., Seurinck J., Debocck F., De Greve H., Lemmers M., Van Montagu M., Schell J. (1984) *EMBO J.* V. 3, p. 835-846.
- Gelvin S.B. (1992) In: Verma D.P.S. (ed.) *Molecular signals in plant-microbe communications*, p. 137-167. CRC Press, Boca Raton.
- Goldmann A., Tempe J., Morel G. (1968) *C.R. Soc. Biol.* V. 162, p. 630-631.
- Goldmann A., Thomas D.W., Morel G. (1969) *C.R. Acad. Sci. (Ser. D)* V. 268, p. 852-854.
- Gordon D.M., Ryder M.H., Heinrich K., Murphy P.J. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 62, p. 3991-3996.
- Grieshaber M., Gäde G. (1976) *J. Comp. Physiol.* V. 108, p. 225-232.
- Gurley W.B., Kemp J.D., Albert M.J., Sutton D.W., Callis J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 77, p. 2828-2832.
- Gussin G.N., Ronson C.W., Ausubel F.M. (1986) *Ann. Rev. Genet.* V. 20, p. 567-591.
- Guyon P., Chilton M.D., Petit A., Tempe J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 77, p. 2693-2697.
- Guyon P., Petit A., Tempe J., Dessaux Y. (1993) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 6, p. 92-98.
- Habeeb L.F., Wang L., Winans S.C. (1991) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 4, p. 379-385.
- Hageman R.V., Burris R.H. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 75, p. 2699-2702.
- Hawes M.C., Smith L.Y. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 5668-5671.
- Hawes M.C., Smith L.Y., Howarth A.J. (1988) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 1, p. 182-186.
- Hayman G.T., Beck von Bodman S., Kim H., Jiang P., Farrand S.K. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 5575-5584.
- Hayman G.T., Farrand S.K. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 1759-1767.
- Hayman G.T., Farrand S.K. (1990) *Mol. Gen. Genet.* V. 223, p. 465-473.
- Higgins C.F. (1992) *Ann. Rev. Cell. Biol.* V. 8, p. 67-113.
- Heyns K., Paulsen H. (1959) *Liebigs Ann. Chimie.* V. 622, p. 160-174.
- Hong S.B., Dessaux Y., Chilton W.S., Farrand S.K. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 401-410.
- Hong S.B., Farrand S.K. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 3576-3583.
- Huffmann G.A., White F.F., Gordon M.P., Nester E.W. (1984) *J. Bacteriol.* V. 157, p. 269-276.
- Hwa V., Salyers A.A. (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 58, p. 869-876.
- Iso gai A., Fukuchi N., Hayashi M., Kamada H., Harada H., Suzuki A. (1988) *Agric. Biol. Chem.* V. 52, p. 3235-3237.
- Jouanin L. (1984) *Plasmid.* V. 12, p. 91-102.
- Jouanin L., Tourneur J., Tourneur C., Casse-Delbart F. (1986) *Plasmid.* V. 16, p. 124-134.
- Jubier M.F. (1972) *FEBS Lett.* V. 28, p. 129-132.
- Kado C.I. (1994) *Mol. Microbiol.* V. 12, p. 17-22.
- Kemp J.D. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 74, p. 862-868.
- Kerr A. (1980) *Plant Dis.* V. 64, p. 25-30.
- Kerr A., Manigault P., Tempe J. (1977) *Nature.* V. 265, p. 560-561.
- Kesters K., De Ley J. (1984) In: Krieg N.G., Holt J.G. (eds.) *Bergey's Manual of systematic bacteriology*, V. 1, p. 244-254. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Kim K.S., Chilton W.S., Farrand S.K. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 3285-3292.
- Kim K.S., Farrand S.K. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 3275-3284.
- Kim R.Y., Gasser R., Wistow G.J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 89, p. 9292-9296.
- Klapwijk P.M. (1977) *J. Gen. Microbiol.* V. 102, p. 1-11.
- Klapwijk P.M., Hooykaas P.J.J., Kesters H.C.M., Schilperoort R.A., Rorsch A. (1976) *J. Gen. Microbiol.* V. 96, p. 155-163.
- Klapwijk P.M., Scheulderman T., Schilperoort R.A. (1978) *J. Bacteriol.* V. 136, p. 775-785.
- Klapwijk P.M., Schilperoort R.A. (1979) *J. Bacteriol.* V. 139, p. 424-431.
- Klein R.M. (1954) *Brookhaven Symp. Biol. Abnormal. Pathol. Plant Growth*, p. 97-114.
- Kovacs L.G., Pueppke S.G. (1994) *Mol. Gen. Genet.* V. 242, p. 327-336.
- Krishnan M., Burgner J.W., Chilton W.S., Gelvin S.B. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 903-905.
- Lam S.T., Gafney T. (1993) In: Chet I. (ed.) *Biotechnology in plant disease control*, p. 291-320. Wiley-Liss, New York.
- Lam S.T., Torkewitz N.R., Nautiyal C.S., Dion P. (1991) *Phytopathology.* V. 81, p. 1163-1164.
- Lejeune B., Jubier M.F. (1968) *C.R. Acad. Sci. (Ser. D)* V. 264, p. 1803-1805.
- Less M., Lanka E. (1994) *Cell.* V. 77, p. 321-324.
- Lioret C. (1956) *Bull. Soc. Fr. Physiol. Veg.* V. 2, p. 76.
- Loake G.J., Ashby A.M., Shaw C.M. (1988) *J. Gen. Microbiol.* V. 134, p. 1427-1432.
- Lukat G.S., Stock J.B. (1993) *J. Cell. Biochem.* V. 51, p. 41-46.
- Magrelli A., Langenkemper K., Dehio C., Schell J., Spina A. (1994) *Science.* V. 266, p. 1986-1988.
- Menage A., Morel G. (1964) *C.R. Acad. Sci.* V. 259, p. 4795-4796.

- Menage A., Morel G. (1965) *C.R. Soc. Biol.* V. 159, p. 561-562.
- Molynieux R.J., Pan Y.T., Goldmann A., Tepfer D.A., Elbein A.D. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* V. 304, p. 81-88.
- Montoya A., Chilton M.D., Gordon M.P., Sciaky D., Nester E.W. (1977) *J. Bacteriol.* V. 129, p. 101-107.
- Morel G. (1956) *Bull. Soc. Fr. Physiol. Veg.* V. 2, p. 75-76.
- Morris R.O. (1986) *Annu. Rev. Plant Physiol.* V. 37, p. 509-538.
- Murphy P.J., Heycke N., Banfalvi Z., Tate M.E., de Bruijn F., Kondorosi A., Tempe J., Schell J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 84, p. 493-497.
- Murphy P.J., Heycke N., Trenz S.P., Ratet P., de Bruijn F.J., Schell J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 85, p. 9133-9137.
- Murphy P.J., Roberts W.P. (1979) *J. Gen. Microbiol.* V. 114, p. 207-213.
- Murphy P.J., Saint C.P. (1992) In: Verma D.P.S. (ed.) *Molecular Signals in Plant-Microbe Communication*, p. 377-390. CRC Press, Boca Raton.
- Murphy P.J., Trenz S.P., Grzemeski W., de Bruijn F.J., Schell J. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 5193-5204.
- Murphy P.J., Wexler M., Grzemeski W., Rao J.P., Gordon D.M. (1995) *Soil Biol. Biochem.* V. 27, p. 525-529.
- Nautiyal C.S., Dion P., Chilton W.S. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 2215-2221.
- O'Connell K.P., Goodman R.M., Handelsman J. (1996) *Trends in Biotechnol.* V. 14, p. 83-88.
- Oger P., Petit A., Dessaux Y. (1997) *Nature/Biotechnology.* V. 15, p. 369-372.
- Otten L., Canaday J., Gerard J.C., Fournier P., Crouzet P., Paulus F. (1992) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 5, p. 279-287.
- Otten L., De Ruffray P. (1994) *Mol. Gen. Genet.* V. 245, p. 493-505.
- Otten L., Gerard J.C., De Ruffray P. (1993) *Plasmid.* V. 29, p. 154-159.
- Pansegau W., Schoumacher F., Hohn B., Lanka E. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 90, p. 11538-11542.
- Parke D., Ornston L.N., Nester E.W. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 5336-5338.
- Paulus F., Canaday J., Otten L. (1991a) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 4, p. 190-197.
- Paulus F., Canaday J., Vincent F., Bonnard G., Kares C., Otten L. (1991b) *Plant Mol. Biol.* V. 16, p. 601-614.
- Petit A., David C., Dahl G.A., Ellis J.G., Guyon P., Casse-Delbart F., Tempe J. (1983) *Mol. Gen. Genet.* V. 190, p. 204-214.
- Petit A., Delhay S., Tempe J., Morel G. (1970) *Physiol. Veg.* V. 8, p. 205-213.
- Petit A., Dessaux Y., Tempe J. (1978b) In: Ride M. (ed.) *Proc. 4-th Int. Conf. Plant Pathog. Bact.*, p. 143-152. INRA, Angers.
- Petit A., Tempe J. (1975) *C.R. Acad. Sci.* V. 281, p. 467-469.
- Petit A., Tempe J. (1978) *Mol. Gen. Genet.* V. 167, p. 147-155.
- Petit A., Tempe J., Kerr A., Holsters M., Van Montagu M., Schell J. (1978a) *Nature.* V. 271, p. 570-571.
- Petit A., Tournier J. (1972) *C.R. Acad. Sci. (Ser D)* V. 275, p. 137-139.
- Powell G.K., Morris R.O. (1986) *Nucleic Acid Res.* V. 14, p. 2555-2565.
- Rao J.P., Grzemeski W., Murphy P.J. (1995) *Microbiol.* V. 141, p. 1683-1690.
- Riker A., Banfield W., Wright W., Keitt G., Sagen K. (1930) *J. Agric. Res.* V. 41, p. 507-540.
- Roberts W.P., Tate M.E., Kerr A. (1977) *Nature.* V. 265, p. 379-380.
- Rossbach S., Kulpa D.A., Rossbach U., de Bruijn F.J. (1994a) *Mol. Gen. Genet.* V. 245, p. 11-24.
- Rossbach S., McSpadden B., Kulpa D., Rasul G., Ganoff M., de Bruijn F.J. (1994b) *Mol. Ecol.* V. 3, p. 610-611.
- Rossbach S., Rasul G., Schneider M., Eardly B., de Bruijn F.J. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 549-559.
- Ruger H.J., Holfe M.G. (1992) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 42, p. 133-143.
- Ryder M.H., Tate M.E., Jones G.P. (1984) *J. Biol. Chem.* V. 259, p. 9704-9710.
- Saint C.P., Wexler M., Murphy P.J., Tempe J., Tate M.E., Murphy P.J. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 5205-5215.
- Salomon F., Deblaere R., Leemans J., Hemalsteens J.P., Van Montagu M., Schell J. (1984) *EMBO J.* V. 3, p. 141-146.
- Sans N., Schindler U., Schröder J. (1988) *Eur. J. Biochem.* V. 173, p. 123-130.
- Sans N., Schröder G., Schröder J. (1987) *Eur. J. Biochem.* V. 167, p. 81-87.
- Savka M.A., Farrand S.K. (1997) *Nature/Biotechnology.* V. 15, p. 363-368.
- Schell J., Van Montagu M., De Beuckeler M., De Block M., Depicker A., De Wilde M., Engler G., Genetello C., Hemalsteens J.P., Holsters M., Seurinck J., Silva R., Van Vliet F., Villarroel R. (1979) *Proc. R. Soc. London (Ser B)* V. 204, p. 251-156.
- Schindler U., Sans N., Schröder J. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 847-854.
- Schrell A., Alt-Mörbe J., Lanz T., Schröder J. (1989) *Eur. J. Biochem.* V. 184, p. 635-641.
- Schröder J., Von Lintig J., Zanker H. (1990) In: Henneke H., Verma D.P.S. (eds.) *Advances in molecular genetics of the plant-microbe interactions*, V. 1, p. 28-31. Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht.
- Shaw C.H., Ashby A.M., Brown A., Royal C., Loake G.J., Shaw C.H. (1988) *Mol. Microbiol.* V. 2, p. 413-417.
- Shirazu K., Kado C.I. (1993) *Nucleic Acid Res.* V. 21, p. 353-354.
- Slightom J.L., Durand-Tardiff M., Jouanin L., Tepfer D. (1986) *J. Biol. Chem.* V. 261, p. 108-121.
- Smith E., Townsend C. (1907) *Science.* V. 24, p. 671-673.
- Soedarjo M., Hemscheidt T.K., Borthakur D. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 60, p. 4268-4272.
- Soto M.J., Zorzano A., Garcia-Rodriguez F.M., Mercado-Blanco J., Lopez-Lara I.M., Olivares J., Toro N. (1994) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 703-707.
- Spano L., Pomponi M., Costantino P., Van Slogteren G.M.S., Tempe J. (1982) *Plant Mol. Biol.* V. 1, p. 291-300.
- Stock A.M., Mowbray S.L. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* V. 5, p. 744-751.
- Stock A., Schaeffer E., Koshland Jr. D.E., Stock J. (1987) *J. Biol. Chem.* V. 262, p. 8011-8014.

- Swords K.M., Dahlbeck D., Kearney B., Roy M., Staskawicz B.J. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 4661-4669.
- Tate M.E., Ellis J.G., Kerr A., Tempe J., Murray K.E., Shaw K.J. (1982) *Carbohydr. Res.* V. 104, p. 105-120.
- Tempe J. (1983) In: Weinstein B. (ed.) *Chemistry and biochemistry of amino acids, peptides and proteins*, V. 7, p. 113-203. Marcel Dekker Inc., NY, Basel.
- Tempe J., Estrade C., Petit A. (1978) In: Ride M. (ed.) *Proc. 4-th Int. Conf on plant pathogenic bacteria*, p. 153-160. INRA, Angers.
- Tempe J., Goldmann A. (1982) In: Kahl G., Schell J. (eds.) *Molecular biology of plant tumors*, p. 427-449. Academic Press, San Diego.
- Tempe J., Guyon P., Petit A., Ellis J.G., Tate M.E., Kerr A. (1980) *C.R. Acad. Sci. (Ser. D)*. V. 290, p. 1173-1176.
- Tempe J., Guyon P., Tepfer D., Petit A. (1979) In: Timmis K.N., Puhler A. (eds.) *Plasmids of medical, commercial and environmental importance*, p. 353-363. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Tempe J., Petit A. (1983) In: Puhler A. (ed.) *Molecular genetics of the bacteria-plant interaction*, p. 14-32. Springer, Berlin.
- Tempe J., Schell J. (1977) In: Legocky A.B. (ed.) *Translation of natural and synthetic polynucleotides*, p. 415-420. University of Agriculture, Poznan.
- Tepfer D. (1989) In: Kosuge T., Nester E. (eds.) *Plant-Microbe Interactions*, p. 294-342. McGraw Hill, New York.
- Tepfer D., Goldman A., Fleury V., Maille M., Message B., Pamboukdjian N., Boivin C., Denarie J., Rosenberg C., Lallemand J.Y., Descouins C., Charpin I., Amarger N. (1988b) In: Palacios R., Verma D.P.S. (eds.) *Molecular genetics of plant-microbe interactions*, p. 139-144.
- Tepfer D., Goldmann A., Pamboukdjian N., Maille M., Lepingle A., Chevalier D., Denarie J., Rosenberg C. (1988a) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 1153-1161.
- Thoai N.V., Robin Y. (1959) *Biochim. Biophys. Acta.* V. 35, p. 446-453.
- Thomashow M.F., Nutter R., Montoya A.L., Gordon M.P., Nester E.W. (1980) *Cell.* V. 19, p. 729-739.
- Unger L., Ziegler S.F., Huffman G.A., Knauf V.C., Peet R., Moore L.W., Gordon M.P., Nester E.W. (1985) *J. Bacteriol.* V. 164, p. 723-730.
- Valdivia R.H., Wang L., Winans S.C. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 6398-6405.
- VandeBroek A., Vanderleyden J. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 800-810.
- Van Egeraat A.W.S.M. (1975) *Plant and Soil.* V. 42, p. 381-386.
- Van Larebeke N., Engler G., Holsters M., Van den Elsacker S., Zaenen I., Schilperoort R.A., Schell J. (1974) *Nature.* V. 252, p. 169-170.
- Van Nuenen M., De Ruffray P., Otten L. (1993) *Mol. Gen. Genet.* V. 240, p. 49-57.
- Vaudequin-Dransart V., Petit A., Poncet C., Ponsonnet C., Nesme X., Jones J.B., Bouzar H., Chilton W.S., Dessaux Y. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 311-321.
- Veluthambi K., Krishnan M., Gould J.H., Smith R.H., Gelvin S.B. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 3696-3703.
- Vimr E.R. (1994) *Trends in Microbiol.* V. 2, p. 271-277.
- Von Lintig J., Kreusch D., Schröder J. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 495-503.
- Von Lintig J., Zanker H., Schröder J. (1991) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 4, p. 370-378.
- Walker J.B. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 818-822.
- Wang L., Helmann J.D., Winans S.C. (1992) *Cell.* V. 69, p. 659-667.
- Watson B., Currier T.C., Gordon M.P., Chilton M.D., Nester E.W. (1975) *J. Bacteriol.* V. 123, p. 255-264.
- Wexler M., Gordon D.M., Murphy P.J. (1995) *Soil Biol. Biochem.* V. 27, p. 531-537.
- Wexler M., Gordon D.M., Murphy P.J. (1996) *Microbiology.* V. 142, p. 1059-1066.
- White F.F., Ghidossi G., Gordon M.P., Nester E.W. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 79, p. 3193-3197.
- White F.F., Nester E.W. (1980) *J. Bacteriol.* V. 141, p. 1134-1141.
- Willmitzer L., De Beuckeleer M., Lemmers M., Van Montagu M., Schell J. (1980) *Nature.* V. 287, p. 359-361.
- Wilson M., Lindow S.E. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 60, p. 4468-4477.
- Wilson M., Savka M.A., Hwang I., Farrand S.K., Lindow S.E. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 61, p. 2151-2158.
- Yamada T., Lee P.O., Kosuge T. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 83, p. 8263-8267.
- Yamada T., Palm C.J., Brooks B., Kosuge T. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 82, p. 6522-6526.
- Zaenen I., Van Larebeke N., Teuchy H., Van Montagu M., Schell J. (1974) *J. Mol. Biol.* V. 86, p. 109-127.
- Zammit V.A., Newsholme E.A. (1976) *Biochem. J.* V. 160, p. 447-462.
- Zanker H., Lurz G., Langridge U., Langridge P., Kreusch D., Schröder J. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 4511-4517.
- Zanker H., Von Lintig J., Schröder J. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 841-849.

Конъюгативные плазмиды и их перенос

Фарранд С.К.

I.	Введение.....	225
II.	Встречаемость трансмиссивных элементов в семействе Rhizobiaceae.....	226
	II.A. Трансмиссивные плазмиды <i>Rhizobium</i>	226
	II.B. Трансмиссивные плазмиды <i>Agrobacterium</i>	227
III.	Конъюгативный перенос Ti-плазмид <i>Agrobacterium</i>	228
	III.A. Структура системы переноса.....	228
	III.A.1. <i>tra</i> -опероны.....	230
	III.A.2. Оперон <i>trb</i>	232
	III.B. Функции и филогения.....	233
	III.C. Системы переноса других крупных плазмид.....	235
IV.	Регуляция конъюгативного переноса Ti-плазмид.....	236
	IV.A. Молекулярные механизмы.....	237
	IV.A.1. Регуляция опионами.....	237
	IV.A.2. Регуляция путем автоиндукции.....	239
	IV.A.3. Регуляторная иерархия.....	241
	IV.B. Модулирующая функция.....	244
	IV.C. Биология регуляторной системы.....	244
	IV.D. TraR, связанный с другими системами.....	246
V.	Характеристики конъюгативного переноса Ti-плазмид.....	248
	V.A. Условия среды.....	248
	V.B. Субстрат для скрещивания.....	249
	V.C. Поверхностное исключение.....	249
	V.D. Чувствительность к бактериофагам.....	250
	V.E. Круг хозяев при конъюгации.....	250
VI.	Системы конъюгативного переноса других плазмид.....	251
	VI.A. Конъюгативный перенос pAgK84.....	251
	VI.B. Другие крупные плазмиды <i>Agrobacterium</i>	251
	VI.C. Плазмиды катаболизма опинов.....	252
	VI.D. Плазмиды усвоения тартрата.....	252
	VI.E. Другие трансмиссивные элементы.....	252
VII.	Биологическое значение.....	253
	VII.A. Поддержание плазмид.....	253
	VII.B. Эволюция плазмид.....	253
	VII.C. Эволюция генома.....	254
VIII.	Благодарности.....	255
IX.	Литература.....	255

I. Введение

Практически все изученные представители семейства Rhizobiaceae содержат одну или несколько плазмид. Большинство из них имеет крупный размер и играет важную роль в жизни этих бактерий, особенно в их взаимодействиях с растениями. Структурно-функциональный анализ показал,

что у любого штамма бактерий даже в составе специфичных для него плазмид имеются участки, консервативные и для других штаммов этого же вида, а иногда встречающиеся у представителей других видов и даже родов. Этот факт послужил основой для того, чтобы рассматривать семейство *Rhizobiaceae* как единую генетическую систему. Во-первых, наличие общих локусов свидетельствует о возможности их возникновения за счет рекомбинации разных плазмид. Например, *sym*-плазмиды имеют участки гомологии с *Ti*- и *Ri*-плазмидами к которым относятся локусы, ответственные за репликацию (Turner, Young, 1995; Turner et al., 1996). Наличие общих (коровых) частей у этих плазмид может быть существенным для их поддержания и рекомбинации, которая служит источником генетической изменчивости. Кроме того, данные плазмиды могут переноситься между разными бактериями в пределах семейства, а возможно и в более удаленные бактерии. Таким образом, эти плазмиды могут быть представителями суперсемейства внехромосомных элементов, имеющих общий регион репликации. В то же время, в составе плазмид как ризобий, так и агробактерий имеются и уникальные области, что говорит о наличии механизмов изоляции и поддержания разнообразия.

Район репликации, тесно связанный с набором консервативных генов, участвующих в конъюгативном переносе некоторых плазмид *Rhizobium* (Turner et al., 1996; Freiberg et al., 1997) и ряда *Ti*-плазмид (Alt-Morbe et al., 1997) может составлять коровую структуру для многих плазмид, выполняющих важные функции в семействе *Rhizobiaceae*. Более того, данные секвенирования показывают, что крупные плазмиды могут рекомбинировать между собой и с другими компонентами бактериального генома. Поэтому системы конъюгативного переноса могут быть важны как в распространении самих плазмид, так и в эволюции всего генома *Rhizobiaceae*. В данной статье мы обсудим организацию систем конъюгативного переноса и их важность для поддержания разнообразия плазмид *Rhizobiaceae*.

II. Встречаемость трансмиссивных элементов в семействе *Rhizobiaceae*

Генетические элементы, передаваемые при скрещивании, описаны практически у всех представителей *Rhizobiaceae*, причем наибольшее число работ выполнено на видах *Rhizobium*. В 1970-1980-х годах был опубликован ряд работ о конъюгативном переносе плазмид *Rhizobium* между различными штаммами этого рода, а также в *Agrobacterium*. Конъюгативные плазмиды были выявлены также у *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. radiobacter* и *A. vitis*, причем наибольшее внимание уделялось плазмидам, контролирующим вирулентность и катаболизм опинов. *Ti*, *Ri* и *At* плазмиды были выявлены у многих штаммов агробактерий и оказались трансмиссивными. Однако интерпретация многих из полученных результатов требует осторожности. Часто интересующие исследователей плазмиды сосуществуют с другими крупными плазмидами, причем разные плазмиды имеют тенденцию формировать коинтеграаты. Хорошей иллюстрацией этого являются штаммы A4 и 8196 *A. rhizogenes* агропинового и маннопинового типа, у которых *Ri*-плазмиды с высокой частотой рекомбинируют с крупными криптическими плазмидами (Petit et al., 1983). Поэтому перенос изучаемой плазмиды может происходить как самостоятельно, так и в результате коинтеграции с другой трансмиссивной плазмидой, а также благодаря транс-активной системе мобилизации, присутствующей в штамм-доноре. Для того, чтобы различить эти случаи, необходимо проводить анализ рекомбинантов, у которых присутствует только одна изучаемая плаزمида.

Данные об отсутствии переноса также необходимо воспринимать с осторожностью. Отсутствие удобных селективных маркеров осложняет выявление переноса, особенно если он происходит с низкой частотой. Кроме того, экспрессия систем конъюгативного переноса подвержена регуляции. Поэтому даже в тех случаях, когда скрещивания проводились в оптимальных условиях, конъюгативный перенос мог быть не зарегистрирован. Иллюстрацией этого является перенос *Ti*-плазмид между штаммами *A. tumefaciens*, у которых конъюгация может детектироваться только в том случае, когда на донор воздействуют особыми сигнальными молекулами.

II.A. ТРАНСМИССИВНЫЕ ПЛАЗМИДЫ *RHIZOBIUM*

Плазмиды *Rhizobium* обычно разделяют на две группы: несущие гены, ответственные за образование клубеньков и азотфиксацию — *sym*-плазмиды (Нооукаас et al., 1981) и криптические или

“несимбиотические” плазмиды (Mercado-Blanco, Toro, 1996). Плазмиды обоих классов могут быть трансмиссивными. Обычно ризобий содержит несколько плазмид, перенос которых может происходить как самостоятельно, так и за счет мобилизации другими плазмидами. Поэтому переносимые плазмиды иногда не являются трансмиссивными, и их перенос связан с присутствием в доноре других мобилизующих систем.

Ситуация еще более осложняется тем, что многие плазмиды *Rhizobium* лишены легко селективируемых маркеров. Эта проблема обычно решается путем получения у донора большого числа независимых встроок транспозона Tn5, часть из которых локализуется в интересующей исследователя плазмиде, что дает возможность следить за ее переносом. Для скрещивания с реципиентом используют либо всю массу полученных транспозантов, либо транспозанты скрещивают с реципиентом индивидуально, после чего выявляют перенос плазмиды по маркеру транспозона.

С использованием этих подходов было показано, что некоторые *sym*-плазмиды ризобий являются самоконъюгативными. К их числу относят плазмиды *R. leguminosarum* bv. *viceae* pRL1J1 (Johnston et al., 1978) и его маркированный Tn5 дериват pJB5J1, а также pRL5J1 (Brewin et al., 1980). Само-трансмиссивными оказались также *sym*-плазмиды pSym5 *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Hooykaas et al., 1981) и pRP2J1 *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Lamb et al., 1982), хотя это не было подтверждено скрещиваниями с донорами, лишенными других систем конъюгации.

Конъюгативными оказались и некоторые “несимбиотические” плазмиды. Так, после маркирования Tn5 штамма 1062 (дериват штамма 300) *R. leguminosarum* была показана конъюгативность двух плазмид — pRL8J1 и pJ110001. Эти плазмиды не контролируют образование клубеньков и азотфиксацию, переносятся с низкими частотами, однако могут с высокой частотой мобилизоваться самоконъюгативной *sym*-плазмидой pRL1J1 (Johnston et al., 1982). С использованием Tn5-мутантов была показана самоконъюгативность криптической плазмиды штамма GR4 *Sinorhizobium meliloti*, имеющей размер 170 т.п.н. Интересно, что эта плазида может мобилизовать другую неконъюгативную криптическую плазмиду штамма GR4, имеющую размер 210 т.п.н. (Mercado-Blanco, Olivares, 1993).

Отбор трансконогентов, возникших в результате переноса плазмид, можно осуществлять и с помощью растения. В этом случае симбиотически активный донор смешивают с невирулентным реципиентом, конъюгационную смесь помещают на среду, селективную только для реципиента, после чего смесью реципиента и возможных трансконогентов инокулируют растения. Клубеньки могут формировать только те клоны, у которых неспособность к симбиозу компенсируется за счет переноса *sym*-плазмиды. Затем бактерии выделяют из клубеньков и анализируют на присутствие плазмид и их маркеров. Таким способом были получены 4 штамма *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, которые возникли за счет переноса (в лабораторных условиях или в почвенном микроскоме) *sym*-плазмиды из симбиотически активного штамма в невирулентный штамм, утративший свою *sym*-плазмиду (Rao et al., 1994).

Sym-плазмиды *S. meliloti* наиболее трудны для изучения из-за своего размера (они часто на порядок крупнее, чем *sym*-плазмиды других ризобий). Обычно эти плазмиды считают неконъюгативными, однако они могут мобилизоваться другими генетическими элементами клетки (Kondorosí et al., 1982). Введение сайта *oriT* из самотрансмиссивной плазмиды, например из RP4, может обеспечить мобилизацию этих очень крупных плазмид в присутствии дополнительной плазмиды-помощника (Pretorius-Guth et al., 1990).

Был выявлен ряд *sym*-плазмид, которые не являются конъюгативными, однако могут быть мобилизованы другими плазмидами. Например, неконъюгативная pSym9 штамма RCC3622 *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (около 400 т.п.н.) может быть мобилизована R-плазмидой RL180 (Hooykaas et al., 1985). Этой же R-плазмидой может быть мобилизована и pSym1 *R. leguminosarum*, имеющая размер 225 т.п.н. (Hooykaas et al., 1982).

II.B. ТРАНСМИССИВНЫЕ ПЛАЗМИДЫ *AGROBACTERIUM*

Ti-плазмиды *A. tumefaciens* являются самоконъюгативными, однако в ранних работах этого показать не удалось. Первые доказательства переноса были получены в опытах *in situ*, еще до того, как было установлено само существование этих плазмид (Kerr, 1969, 1971). Окончательные дока-

зательства появились после того, как удалось подобрать адекватные условия для активации систем конъюгативного переноса (Kerr et al., 1977; Genetello et al., 1977). В результате была показана конъюгативность классических октопин/маннитилопиновых и нопалин/агроцинопиновых Ti-плазмид типа A+B, а также Ti-плазмиды pTiBo542. Затем конъюгативность была обнаружена у вновь выявленных Ti-плазмид хризопинового типа, таких как pTiChry5 (Kovacs, Pueppke, 1994; Vaudequin-Dransart et al., 1996), у мега-Ti-плазмид с ограниченным кругом хозяев, выявленных у штаммов *Lippia A. tumefaciens* (Unger et al., 1985) и у некоторых Ti-плазмид из штаммов биотипа 3, заражающих виноград и сейчас называемых *A. vitis* (Szegedi et al., 1992). В дополнение к наиболее изученным Ti-плазмидам агробактерий, трансмиссивность была выявлена и у других внехромосомных элементов, таких как плазмиды катаболизма опинов (Ellis et al., 1982b), pAgK84, кодирующая синтез агроцина 84 (Farrand et al., 1985) и Tt-плазмиды, кодирующие утилизацию тартрата (Szegedi et al., 1992).

Более сложные данные получены при изучении *A. rhizogenes*. У большинства штаммов маннопинового и агропинового типа выявлены 3 крупные плазмиды. При этом две меньшие плазмиды коинтегрируются, образуя наибольшую плазмиду. Это было показано для Ri-плазмиды маннопинового типа pRi8196, которая оказалась трансмиссивной и возможно, самоконъюгативной (Petit et al., 1983). До сих пор неясно, является ли конъюгативной Ag-плазида этих бактерий. Очевидно, что Ri- и Ag-плазмиды двух штаммов агропинового типа, A4 и 15834 могут переноситься при конъюгации, однако еще предстоит выяснить, являются ли обе они самоконъюгативными. Интересно, что способность к утилизации 4 маннитоловых опинов, вырабатываемых в волосатых корнях, разделена между этими двумя плазмидами: Ri-плазида контролирует рост на агропине, но не на маннопине и маннопиновой кислоте, тогда как последние два соединения катаболизируются благодаря генам, присутствующим на Ag-плазмиде (Petit et al., 1983).

Большинство штаммов *Agrobacterium* содержит очень крупные плазмиды (350-450 т.п.н.). До недавнего времени данные о родстве этих плазмид у разных штаммов отсутствовали. Однако выяснилось, что по крайней мере у некоторых штаммов эти плазмиды контролируют катаболизм соединений Амадори, спонтанно образующихся в растительных остатках (Vaudequin-Dransart et al., 1995; Kim, Farrand, 1996), что может говорить о наличии на них общих генов. Одна из этих плазмид, pAtC58 оказалась самотрансмиссивной (van Montagu, Schell, 1979).

Имеется лишь некоторая информация о системе конъюгативного переноса pAgK84, полученная путем анализа инсерций и делеций, которые позволили выявить локус переноса размером 3 т.п.н. (Farrand et al., 1985, 1992). Его размер чересчур мал для того, чтобы кодировать всю систему конъюгации, и таким образом перенос pAgK84, по-видимому, определяется и другими генами, имеющимися у донорного штамма агробактерий. Можно предположить и то, что данная плазида обладает уникальной системой конъюгации, которая кодируется всего несколькими генами (раздел VI).

III. Конъюгативный перенос Ti-плазмид *Agrobacterium*

Для Ti-плазмид характерно наличие двух альтернативных систем конъюгативного переноса. Одна из них обеспечивает перенос сегмента Ti-плазмиды (Т-ДНК) из бактерий в растительные клетки, а другая - перенос целых плазмид между разными штаммами бактерий. Обе системы изучены на уровне последовательностей ДНК. Они являются независимыми: *vir*-опосредованный перенос Т-ДНК в растение не требует *tra*-функций (Rogowsky et al., 1990), а *tra*-зависимый перенос плазмид между разными бактериями не требует наличия *vir*-системы (Cook et al., 1997). Более того, анализ филогенетического сходства показал, что эти две системы имеют разное происхождение, хотя между ними и могло происходить перераспределение генетических факторов.

III.A. СТРУКТУРА СИСТЕМЫ ПЕРЕНОСА

Концептуально функции переноса бактериальных плазмид подразделяют на: (1) связанные с метаболизмом ДНК, (2) Dri-функции, (3) функции транспорта ДНК из донора в реципиент и (4)

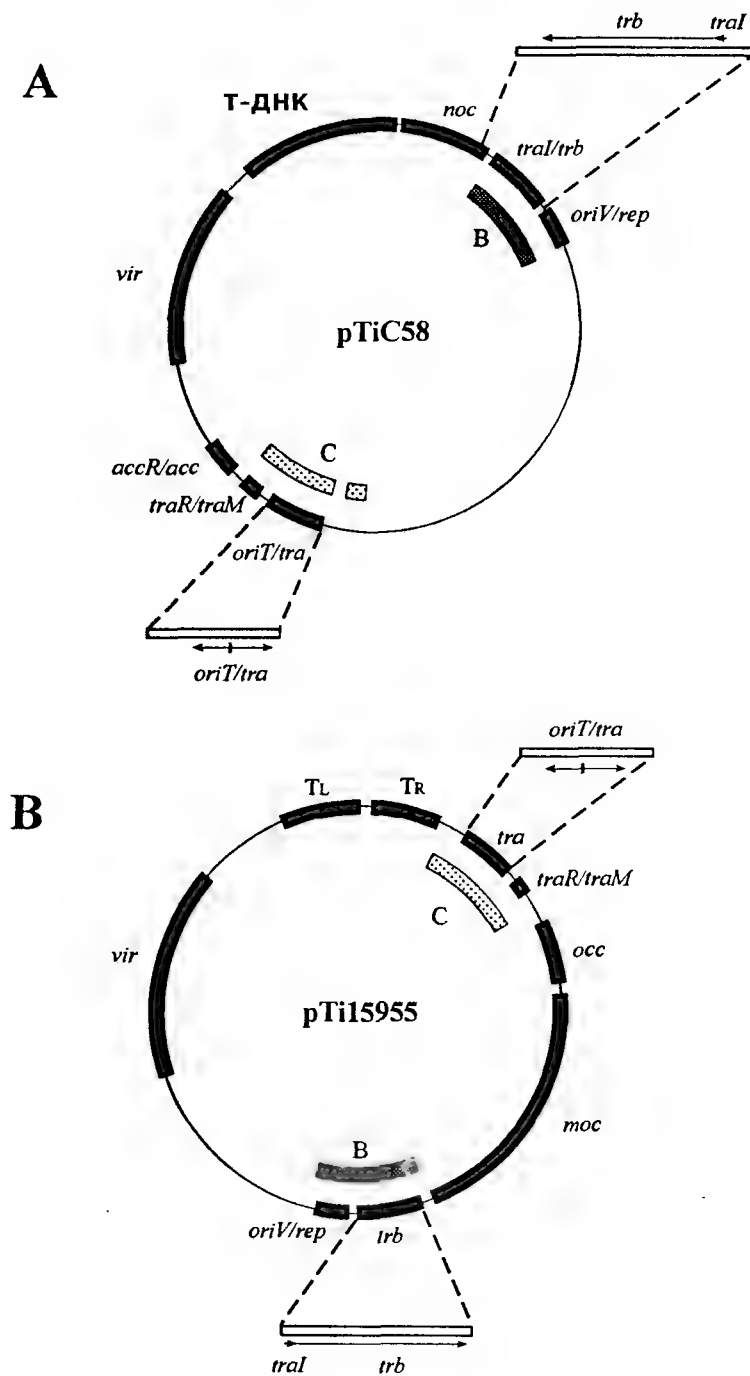


Рисунок 1. Карты наиболее изученных Ti-плазмид.

A - pTiC58 (нопапин-агроцинопиновый тип). В - pTi15955 (октопин-маннитоловый тип). Т - Т-ДНК; Т_Л и Т_Р - левый и правый участки Т-ДНК, соответственно. *nos* - катаболизм нопалина, *oss* - катаболизм октопина, *acc* - катаболизм агроцинопинов А и В, *mos* - катаболизм маннитоловых опинов, *oriV/rep* - локус репликатора, *vir* - локус вирулентности, *traR/traM* - транскрипционный активатор и антиактиватор *tra*-регулона, *traI/trb* - *trb*-оперон в *tra*-регулоне, *oriT/tra* - два противоположно направленных *tra*-оперона, фланкирующие *oriT*. В и С - районы высокой гомологии разных плазмид, выявленные путем анализа гетеродуплексов (Engler et al., 1981).

Mrf-функции. Dtr-система состоит из цис-активного сайта *oriT*, в котором начинается перенос, а также из генов, кодирующих белки процессинга ДНК. Эти белки взаимодействуют с *oriT*, образуя релаксосому — ДНК-белковый комплекс, в котором происходит надрезание и другие реакции процессинга. Mrf-система — это сложная, мало охарактеризованная структура, которая, по-видимому, расположена в наружной и внутренней мембранах донорной бактерии. Она образует канал, по которому переносится ДНК, а также структуры, участвующие в прикреплении донора к реципиенту и в образовании поры. До сих пор неясно, осуществляются ли эти функции одной структурой или несколькими независимыми, но взаимодействующими компонентами.

К настоящему времени охарактеризованы гены, контролирующие конъюгативный перенос нопалин-агроцинопиновых A+B Ti-плазмид и октопин-маннитоловых Ti-плазмид опинового типа. Гены переноса этих двух типов плазмид очень сходны, что говорит об их общем происхождении. Более того, их Dtr- и Mrf-функции взаимозаменяемы (Cook, Farrand, 1992; Cook et al., 1997), что также говорит о консервативности соответствующих генов.

Мутационный анализ показал, что конъюгативные функции обеих плазмид контролируются двумя кластерами генов (Holsters et al., 1980; DeGreve et al., 1981; Beck von Bodman et al., 1989). Один из этих кластеров, кодирующий Dtr-функции, сцеплен с локусом катаболизма конъюгативного опиона — октопина для pTiR10 и агроцинопина для A+B из pTiC58 (рис. 1). Этот кластер соответствует району гомологии C (Engler et al., 1981). Второй кластер, контролирующий Mrf-функции, тесно сцеплен с районом репликации обеих Ti-плазмид и соответствует району гомологии B.

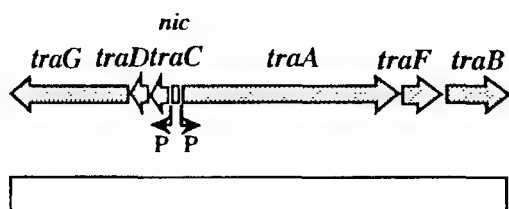
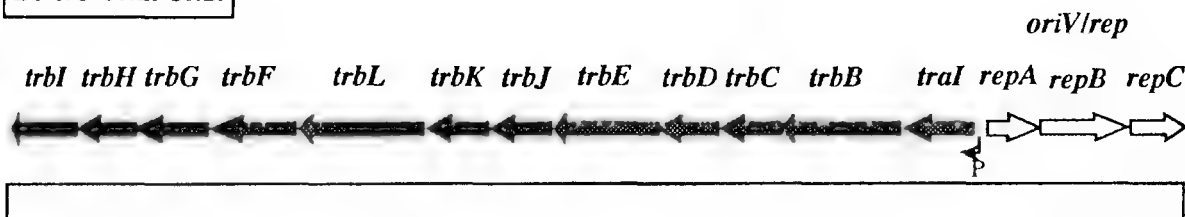
III.A.1. *tra*-опероны

Гены, кодирующие метаболизм ДНК, на обеих плаزمидах организованы в 2 оперона, считываемые в противоположных направлениях с межгенного района, содержащего *oriT* (рис. 2A). На pTiC58 первый оперон, считываемый по часовой стрелке, содержит 3 гена (*traA*, *traF*, *traB*), а второй оперон состоит из генов *traC*, *traD*, *traG* (Farrand et al., 1996).

Минимальная последовательность *oriT* содержит 65 пар нуклеотидов и расположена между *tra*-оперонами (Cook, Farrand, 1992). В ней находится домен из 12 пар нуклеотидов, идентичный *nic*-домену плазмиды RSF1010 группы IncQ, обладающей широким спектром хозяев. Кроме того, выявлен инвертированный повтор, который является общим для всех сайтов *oriT*, однако он отличается от повтора, находящегося вблизи *nic*-сайта RSF1010. Хотя домен из 65 пар нуклеотидов и является минимальной единицей, конъюгативный перенос с частотами, характерными для “дикого типа”, требует наличия инвертированных повторяющихся элементов, расположенных по обе стороны от коровой последовательности (Cook, Farrand, 1992). Эти элементы, являющиеся общими для разных *oriT*, определяют вторичную структуру ДНК. Интересно, что хотя домен из 12 пар оснований является идентичным для плазмид pTiC58 и pTiR10, фланкирующие участки, содержащие инвертированные повторы, заметно различаются (Alt-Morbe et al., 1996). Тем не менее, минимальный район (65 пар оснований) pTiC58 в транс-положении обеспечивает перенос pTiR10 (Cook, Farrand, 1992).

Генетический анализ и изучение последовательностей показало, что гены *traA*, *traF*, *traC*, *traD*, *traG* необходимы для конъюгации, а *traB* — обеспечивает высокую частоту переноса (Farrand et al., 1996). Функции кодируемых белковых продуктов, хотя не были изучены биохимически, могут быть предсказаны на основании аминокислотных последовательностей.

Белок TraA имеет массу 123 кДа и содержит домен, характерный для сайт-специфических одонитевых эндонуклеаз разных конъюгативных плазмид (Farrand et al., 1996; Alt-Morbe et al., 1996). Эти ферменты осуществляют надрезание ДНК в соответствующих сайтах *oriT*, с которых начинается конъюгативный перенос. Кроме того, TraA содержит домен, сходный с хеликазным доменом TraI — *oriT*-специфичной одонитевой нуклеазы F-плазмиды. Возможно, эта активность связана с разворачиванием реплицирующейся молекулы ДНК во время переноса нити. Возможно, что TraT работает как сайт-специфическая одонитевая эндонуклеаза, обеспечивающая возникновение надрезов в сайте *oriT* Ti-плазмиды.

А. *tra* ОПЕРОНЫ**В. *trb* ОПЕРОНЫ**Рисунок 2. Генетические карты *tra*-регулонов.

А — два *tra*-оперона, транскрибируемые в противоположных направлениях. Между ними находится *oriT* с *nic*-сайтом и промотор *p*, регулируемый белком *traR*.

В — *trb*-оперон. На разных типах Ti-плазмид он тесно сцеплен с локусом репликации. Ген *traI*, предположительно, кодирует автоиндуктор. Остальные *trb*-гены необходимы для осуществления Mpf-функций.

TraC и TraD являются небольшими белками, не имеющими гомологов в базах данных. Drt-участки конъюгативных систем других плазмид также содержат небольшие белки, необходимые для сборки и стабилизации релаксосом (Pensegrau et al., 1990; Scherzinger et al., 1992). Возможно, что TraC и TraD выполняют эти функции в релаксосоме Ti-плазмиды. TraF сходен с одноименным белком, кодируемым *tra*-системой плазмиды RP4 группы IncPIa (Farrand et al., 1997). В случае RP4 белок TraF не является частью Drt-системы, а необходим для работы Mpf-системы (Waters et al., 1992). Белок TraB не имеет гомологов в базах данных и не является абсолютно необходимым для конъюгации.

Между генами *virE2* и *virF* на октопин-маннитоловых Ti-плазмидах опинового типа выявлена дупликация последовательности ДНК, которая начинается в 3'-конце кодирующей части *traA* и заканчивается в 5'-части кодирующей части *traB* (Farrand et al., 1996). Эта последовательность весьма консервативна, особенно в участке, гомологичном *traF*, однако ее нарушение не влияет на образование опухолей (Melchers et al., 1990). Такая дупликация отсутствует в *vir*-регионе pTiC58 и, возможно, представляет собой след ранее происходивших рекомбинационных событий.

Большой интерес представляет белок TraG, поскольку практически все известные системы конъюгации содержат его гомологи. К ним относят белки TraG (RP4), TrwB (R388), TraD (F) и VirD4 Ti- и Ri-плазмид (Lessl et al., 1992). Эти белки важны для переноса плазмид, причем в случае RP4 белок TraG не является компонентом поры или релаксосомы. В то же время, TraG и VirD2 содержат предполагаемые мембранные домены. Более того, VirD4 (pRiA4) фракционируется как компонент мембраны (Okamoto et al., 1991). Возможно, что TraG (RP4) обеспечивает контакт релаксосомы с конъюгативным мостиком во время активного экспорта ДНК в реципиен-

тную клетку. Генетический анализ показал, что *TraG* (pTiC58) важен для конъюгации (Farrand et al., 1996) и, будучи консервативным, может выполнять ту же функцию, что и *TraG* (RP4).

Использование транспозонов, содержащих *lacZ*, показало, что оба *tra*-оперона pTiC58 содержат находящиеся “вниз по течению” гены, входящие в ту же единицу транскрипции. Однако полученные инсерции не влияют на конъюгативный перенос полноразмерной Ti-плазмиды (Farrand et al., 1996). Анализ последовательностей показал, что данные участки pTiR10 содержат потенциальные рамки считывания: одну после *traG* и четыре после *traB* (Alt-Morbe et al., 1996), не имеющих гомологов в базах данных. Такая организация напоминает *tra*-регион RP4, в котором несколько дистальных генов лидерного и примазного оперонов не влияют на перенос плазмиды (Pansegrau et al., 1994).

III.A.2. Оперон *trb*

Гены, предположительно отвечающие за формирование конъюгационного мостика, организованы в единый кластер, тесно сцепленный с регионом *oriV/rep* плазмид pTiR10 и pTiC58 (Alt-Morbe et al., 1996). Этот кластер, обозначенный *trb*, может содержать 12 генов (рис. 2B). Ген *traI* кодирует синтазу аутоиндуктора *Agrobacterium* (раздел IV). Остальные 11 генов (*trbB-trbL*) гомологичны одноименным генам *trb*-оперона RP4 (Alt-Morbe et al., 1996). Они кодируют белки, связанные с конъюгационным мостиком, необходимым как для переноса плазмиды, так и для проявления признака поверхностного исключения (Haase et al., 1996) и устойчивости к RP4-специфичным фагам (Grahn et al., 1997). Как и гомологи из системы RP4, *trb*-гены Ti-плазмиды содержат N-терминальные сигналы секреции, а некоторые — также и мембранные домены. Порядок этих 11 генов на RP4 и Ti-плазмидах несколько различается. На RP4 гены *trbJKL* занимают дистальное положение, а на Ti-плазмидах они расположены между генами *trbE* и *trbF*.

В *trb*-локусе плазмиды pTiC58 были получены 6 инсерций Tn5, каждая из которых нарушала конъюгативный перенос (Beck von Bodman et al., 1989). Ранее мы получили неполярные инсерционные мутации во всех 11 *trb*-генах. Все они, за исключением инсерции в *trbK*, нарушали конъюгативный перенос Ti-плазмиды. Все *trb*-гены, кроме *trbK* и дистально расположенных генов *trbM*, *trbN*, *trbO*, *trbP*, не имеющих гомологов на Ti-плазмиде, необходимы для переноса R-плазмиды (Lessl et al., 1993; Haase et al., 1995).

Trb-гены обеих Ti-плазмид могут экспрессироваться как единый оперон с промотора, находящегося перед *traI*. Однако комплементационный анализ Tn5-мутаций показал, что *trb*-гены pTiC58 могут быть организованы по меньшей мере в 2 единицы транскрипции (Beck von Bodman et al., 1989). Это подтвердили и наши исследования, однако локализовать промотор, с которого считывается второй оперон, пока не удалось.

Результаты генетического анализа и секвенирования дают лишь косвенные доказательства участия *trb*-генов в формировании конъюгативного мостика, а биохимическое изучение продуктов, кодируемых этими генами или их локализация в бактериальной клетке (цитоплазма, наружная или внутренняя мембрана) не проводились. Остается нерешенным и вопрос о возможности образования половых пилей. Хотя многие считают, что RP4 кодирует образование пилей, его физические или биохимические доказательства пока отсутствуют (Haase et al., 1995). Исходя из данных секвенирования, можно предположить, что *trbC* кодирует структурный белок пилей RP4. Кроме того, *TrbF* обладает протеазной активностью, необходимой для разрезания белка *TrbC* (Haase, Lanka, 1997). Такой посттрансляционный процессинг характерен для созревания и сборки белков пилей (Silverman, 1997). Поскольку кластеры *tra*- и *trb*-генов Ti-плазмид содержат гомологи *traF* и *trbC*, можно предположить, что Ti-плазмиды также контролируют образование пилей. Однако попытки электронно-микроскопического выявления пилей, связанных с конъюгативной системой pTiC58, остались безуспешными.

Анализ локализации *trb*-генов на картах Ti-плазмид октопин-маннитолового опинового типа позволил выявить особенность, характерную для одного из наиболее изученных штаммов *A. tumefaciens*. Штамм A348, который активно изучался в группе Ю.Нестера, представляет собой лабораторный дериват, у которого pTiA6NC, выделенная из штамма A6, введена в штамм A136 (Knauf, Nester, 1982). Последний является устойчивым к рифампицину и налидиксовой кислоте

мутантом NT1 — излученного от Ti-плазмиды нопалин-агроцинопинового штамма C58 (Watson et al., 1975). Таким образом, A348 представляет собой хромосомный аналог C58, Ti-плазида которого не проявляет конъюгативности даже в оптимальных условиях индукции октопином (разд. IV). Оказалось, что плазида pTiA6NC содержит делецию (около 12 т.п.н.) вблизи региона 5, которая захватывает *trbI* — последний ген оперона, а также часть региона, необходимую для катаболизма маннопиновой кислоты (Sciaky et al., 1977; Alt-Morbe et al., 1996). Возможно, что эта делеция определяет неспособность плазмиды к переносу. Интересно, что другие клоны штамма A6 содержат способные к конъюгации Ti-плазмиды (Zhang, Kerr, 1991). Таким образом, данная делеция возникла уже после распространения штамма A348 по различным лабораториям мира.

III.В. ФУНКЦИИ И ФИЛОГЕНИЯ

Как уже отмечалось, гены, контролирующие конъюгативный перенос Ti-плазмид, находятся в 2 дискретных кластерах — *tra* и *trb*, хотя дополнительные функции, необходимые для переноса, могут кодироваться и другими участками плазмиды. Имеется два сообщения об участии в контроле этих функций *vir*-регулона. Инсерционные мутации в некоторых *vir*-генах не только нарушают онкогенность, но и резко снижают частоту конъюгативного переноса Ti-плазмид (Gelvin, Hakeck, 1990; Steck, Kado, 1990). Нормальная частота этого переноса восстанавливается после того, как исходные аллели *vir*-генов вводятся в транс-положении.

Позднее с использованием бинарной *tra*-системы было показано, что *vir*-гены не участвуют в конъюгативном переносе (Cook et al., 1997). Была сконструирована система, в которой *tra/oriT* находился на одной плазмиде, а *trb* — на другой. Конъюгативные функции, контролируемые двумя независимыми репликациями, катализировали перенос той плазмиды, которая содержала *oriT*. Частота этого переноса была такой же, как для интактной Ti-плазмиды в отсутствие любых компонентов *vir*-регулона. Авторы предположили, что влияние *vir*-мутаций на конъюгативный перенос связано с доминантно-негативными эффектами измененных продуктов *vir*-генов. Это предположение согласуется с данными об аллельной специфичности влияния *vir*-мутаций на конъюгацию: одни мутации в данном гене оказывали это влияние, а другие — не оказывали.

Использование бинарных систем позволило доказать, что гены, находящиеся после *traG* и *traB* в 2-х *tra*-оперонах, несущественны для конъюгации. Использование различных конструкций *tra/oriT* показало, что хотя ген *traB* важен для достижения максимальной частоты переноса, он не является необходимым для конъюгации (Cook et al., 1997).

Сравнительный анализ последовательностей *tra*-систем из нопалин-агроцинопиновых A+B-плазмид и октопин-маннитоловых Ti-плазмид показал их сходство (Farrand et al., 1996; Alt-Morbe et al., 1996). Это согласуется с данными о том, что плазида, несущая *oriT* из pTiC58, может быть мобилизована *tra*-системой pTi15955, а также функционирует в сочетании с *tra/oriT* pTiC58 (Cook et al., 1997; Cook, Farrand, 1992). Очевидно, что *tra*- и *trb*-системы этих двух типов плазмид функционально взаимозаменяемы. В то же время, эти системы не являются идентичными. Фактически, имеются значительные различия между *tra*-системами двух типов Ti-плазмид, особенно по белкам, кодируемым *trb*-генами. Хотя по некоторым белкам имеются высокие уровни гомологии (80-90%), по другим (TrbD, TrbH и особенно по TrbK) выявлены существенные различия (данные автора).

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей позволяет пролить свет и на происхождение системы конъюгативного переноса. Очевидно, что эта система является химерной (табл. I). По локусу *oriT* выявляется сходство с R-плазмидой широкого круга хозяев RSF1010, относящейся к группе IncQ (Cook, Farrand, 1992). Соответственно, домен TraA, который предположительно является ферментом, никирующим *oriT*, сходен с MobA — никирующим ферментом RSF1010 (Farrand et al., 1996; Alt-Morbe et al., 1996). Таким образом, они являются представителями широко распространенного семейства ферментов: сходные сайты *oriT* найдены в разных плазмидах грам-положительных и грам-отрицательных бактерий, включая pTF1, pSC101, pG01, pIP501 (Climo et al., 1996). Однако TraA Ti-плазмиды содержит второй домен, сходный с хеликазным доменом TraI — никирующим ферментом *oriT* F-плазмиды (Farrand et al., 1996; Alt-Morbe et al.,

Таблица 1. Филогенетические отношения компонентов *tra*-систем Ti-плазмид

Ti-плазида	Гомологичная система	Известная или предполагаемая функция
<i>oriT</i>	RSF1010/R1162, pSC101, pTF1, pG01, pIP501	Сайт инициации переноса
Функции метаболизма ДНК		
TraA: N-концевой домен	MobA RSF1010 или R1162	<i>oriT</i> -специфичная эндонуклеаза
TraA: C-концевой домен	C-концевой домен TraI (F)	Хеликаза
Конъюгационный мостик		
Белки Trb	Белки Trb RP4	Конъюгационный мостик/пили
TrbK	TrbK RP4	Поверхностное исключение
TraF	TraF RP4	Протеаза, процессинг белков препилина
Релаксосома и конъюгационный мостик		
TraG	TraG RP4 VirD4 Ti(Ri)-плазмид	Взаимодействие релаксосомы с конъюгационным мостиком

1996). Этот домен отсутствует в белках MobA RSF1010 и неродственной плазмиды pTF1. Возможно, что *traA* возник путем слияния *mobA*-подобного гена с геном хеликазы или с хеликазным доменом гена *traI* F-плазмиды.

Хотя первичные Drt-функции *tra*-системы для Ti-плазмид сходны с таковыми для RSF1010, Mpf-функции кодируются генами, имеющими гомологов на RP4. *trb*-гены и *traF* Ti-плазмид проявляют высокую гомологию с генами RP4, но их порядок совершенно другой. Кроме того, ген *traG*, определяющий специфичность релаксосомы и конъюгационного мостика, также имеет гомолога на RP4. Интересно, что этот ген имеет гомолога и в составе *vir*-системы (*virD4*). В то же время, Mpf-функции Ti-плазмид и RP4 заметно различаются. Ti-плазида не может мобилизовать перенос плазмиды, содержащей *oriT* RP4 (Cook, Farrand, 1992). Также и RP4 не мобилизует рекомбинантные плазмиды, содержащие *tra/oriT* pTiC58. Кроме того, Ti-плазмиды не контролируют чувствительность к PRR1 и PRD1 — бактериофагам, зависимым от Mpf-системы RP4 в отношении прикрепления и инфекции (данные автора).

Таким образом, *tra*-системы двух рассмотренных типов Ti-плазмид имеют компоненты, присутствующие как на RSF1010, так и на RP4. Такая же химерность выявлена и для *vir*-систем. Так, Drt-функции в них (определение границ T-региона, никирование) осуществляются белком VirD2, имеющим гомологов на RP4 (Pansegrau, Lanka, 1991), тогда как компонент Mpf-системы, *virB*, имеет гомологов на плазмиде pKM101 группы IncN (Pohlman et al., 1994). Интересно, что для *tra*- и *vir*-систем белки, ответственные за связывание комплекса релаксосомы с конъюгативной порой, имеют гомологов в системе переноса IncP1: белки TraG для переноса Ti-плазмиды и VirD4 для переноса T-ДНК близки к белку TraG, кодируемому плазмидой RP4 (Lessl et al., 1992; Farrand et al., 1996).

Данная химерность проявляется в некоторых свойствах специфичности. Например, RSF1010 имеет собственную Drt-систему в форме *oriT* и белковых компонентов релаксосомы — MobA, MobB, MobC (Scholtz et al., 1989; Scherzinger et al., 1992). Однако плазмиды группы IncQ лишены Mpf-системы и не кодируют TraG-подобных функций. Поэтому данные плазмиды не являются само-

конъюгативными, хотя и могут быть мобилизованы RP4: плазмида IncP1 является носителем Mpf-функции. Важно, что TraG RP4 узнает релаксому RSF1010 и может взаимодействовать с нуклеопротеиновым комплексом конъюгативной поры RP4. При этом *vir*-система Ti-плазмиды может мобилизовать перенос RSF1010 как в растительные, так и в бактериальные клетки (Buchanan-Wollaston et al., 1989; Beijersbergen et al., 1992). Возможно, что VirD4 узнает релаксому RSF1010 и может обеспечивать ее перенос через пору, образуемую белками VirB.

Неожиданным оказалось то, что хотя *oriT* и предполагаемая никаза *tra*-системы Ti-плазмиды имеют гомологию с компонентами системы переноса RSF1010, Ti-плазмида не может мобилизовать перенос R-плазмид группы IncQ (Cook, Farrand, 1992). Это противоречит тому факту, что Mpf-система Ti-плазмид родственна RP4 и, как уже отмечалось, может мобилизовать RSF1010. Эти противоречивые наблюдения удалось объяснить тем, что неспособность *tra*-системы Ti-плазмиды мобилизовать RSF1010 связана со специфичностью, определяемой белком TraG. Поэтому когда собственный белок TraG плазмиды pTiC58 замещен белком RP4, Ti-плазмида приобретает способность мобилизовать RSF1010 (Hamilton et al., 1996). Возможно, что TraG Ti-плазмиды не может узнавать релаксому RSF1010, однако TraG (RP4) узнает конъюгационный мостик Ti-плазмиды. Более того, ген *traG* (RP4) комплементирует мутацию в гене *traG* Ti-плазмиды, то есть может узнавать релаксому Ti-плазмиды. Поэтому хотя ген *traG* Ti-плазмиды и проявляет измененную хозяйскую специфичность, его гомолог, кодируемый RP4, имеет более широкие возможности для узнавания релаксомы.

III.C. СИСТЕМЫ ПЕРЕНОСА ДРУГИХ КРУПНЫХ ПЛАЗМИД

До недавнего времени данные о *tra*-системах, обеспечивающих перенос крупных плазмид Rhizobiaceae, отсутствовали. Однако недавно была определена полная нуклеотидная последовательность *sum*-плазмиды штамма NGR234 *Rhizobium* sp. (Freiberg et al., 1997). Она имеет размер 536 т.п.н. и содержит набор *tra*-генов, который сходен с *tra*-генами рассмотренных выше Ti-плазмид. Коровый регион *oriT* сходен с таковым для pTiC58, причем это сходство распространяется и на инвертированные повторы, прилежащие к данному локусу. Более того, оперон *trb* содержит гомолог гена *traI* и тесно сцеплен с читаемым в противоположном направлении репликаторным регионом, как это характерно и для других Ti-плазмид. Плазмида pNGR234a является самоконъюгативной, и ген *trbE*, находящийся в составе ее *trb*-оперона, разделен на две открытые рамки считывания. Возможно, что функция этого гена либо выполняется двумя разными продуктами, либо в последовательности ДНК имеется мутация. В то же время, pNGR234a и Ti-плазмиды имеют общий ориджин репликации и конъюгации. Интересно, что регионы *trb/oriV-rep* и *tra/oriT* тесно сцеплены на pNGR234a, тогда как на Ti-плазмидах они разделены участком не менее чем в 100 т.п.н.

Локусы *tra* и *trb* выявлены также на pAtK84b — плазмиде размером 173 т.п.н., контролирующей катаболизм нопалина и агроциопинов А и В. Эта плазмида, выявленная у непатогенного штамма K84 *A. radiobacter*, является самоконъюгативной, и ее перенос, как и в случае многих Ti-плазмид, индуцируется определенным набором опинов (раздел VI). Гибридизационный анализ показал наличие обширных участков гомологии pAtK84b и pTiC58, включающих *tra/oriT* и *trb/oriV-rep* (Clare et al., 1990). В то же время, pAtK84b лишена *vir*- и Т-регионов pTiC58. Поэтому логично предположить, что pAtK84b возникла путем делеции данных регионов у Ti-плазмиды, чем и объясняется сходство генов, кодирующих *tra*-функции.

Регионы *trb/oriV-rep* и *tra/oriT* pTiB₈₀₆ (октопин-маннитоловая Ti-плазмида опинового типа) имеют обширные гомологии с другими плазмидами агробактерий, включая pTiT37, pTiK27, pTi233, pTiIBV7, а также плазмиду pAtAg19b, кодирующую катаболизм опинов (Drummond, Chilton, 1978). Плазмиды pTiT37 и pTiK27 являются самоконъюгативными (Ellis et al., 1982b). Другими авторами (Otten et al., 1993; Otten, De Ruffray, 1994) было выявлено высокое сходство между регионами *trb/oriV-rep* и *tra/oriT* плазмид pTiC58, pTiAch5 и Ti-плазмид *A. vitis*, имеющих широкий спектр хозяев и относящихся к октопин-кукомопиновому и нопалиновому типам. Выявлена колинеарность большого сектора этих плазмид *A. vitis*, кодирующего *tra*-функции, и региона pTiC58,

расположенного по часовой стрелке относительно *trb/oriV-rep* и *tra/oriT*. Этот регион, имеющийся у трех разных Ti-плазмид, может иметь общее происхождение.

Другие Ti-плазмиды изучены в меньшей степени. Показано некоторое сходство между регионом *trb/oriV-rep* у pTiB₆806 и Ti-плазмиды агропинового типа pTiBo542, хотя гибридизационный ответ был слабым (Drummond, Chilton, 1978). Более того, pTiBo542 проявляет необычные свойства несовместимости с pTiAch5, что говорит о существенной разнице в структуре репликаторного района (Komari et al., 1986). Однако pTiBo542 является самоконъюгативной и ее перенос индуцируется опинами, что характерно для конъюгативных систем Ti-плазмид (Ellis et al., 1982a, 1982b; раздел IV).

Очень мало известно о системах конъюгации Ri-плазмид. Известно, что некоторые Ri-плазмиды агропинового и маннопинового типа могут передаваться между разными штаммами при конъюгации (Moore et al., 1979; Petit et al., 1983). Однако у наиболее изученных штаммов агропинового и маннопинового типов Ri-плазмиды стабильно сосуществуют и легко образуют коинтеграаты с другими имеющимися крупными плазмидами (White, Nester, 1980; Petit et al., 1983). Дополнительные плазмиды в штаммах агропинового типа кодируют катаболизм опинов, образующихся в индуцируемых "волосатых корнях", тогда как в случае штамма маннопинового типа 8196 их функции неясны (Petit et al., 1983). Анализ скрещиваний показал, что Ri-плазмиды маннопинового типа могут быть самоконъюгативными. В то же время, данные, полученные при изучении плазмид агропинового типа, более трудно интерпретировать. Данные о совместном наследовании согласуются с гипотезой о том, что плаزمид катаболизма опинов мобилизует перенос Ri-плазмиды (Petit et al., 1983). Это согласуется с результатами Саузерн-гибридизации, показавшей лишь слабое сходство участка *trb/oriV-rep* у pTiB₆806 и у агропиновой Ri-плазмиды pHRI (Jouanin, 1984). В то же время, между регионами *tra/oriT* данных плазмид не было выявлено сходства.

Данные о нуклеотидных последовательностях *tra*-генов, обеспечивающих перенос плазмид *Rhizobium*, ограничиваются pNGR234a. В то же время, плазмиды pSym9 *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* и pSym5 *R. leguminosarum* bv. *folii* содержат участки, которые активно гибридизуются с регионами *trb/oriV-rep* и *tra/oriT* pTiAch5 (Prakash, Schilperoort, 1982). pSym5 является самотрансмиссивной (Hooykaas et al., 1981) и таким образом может содержать коровый регион для переноса и репликации, имеющийся на Ti-плазмидах.

IV. Регуляция конъюгативного переноса Ti-плазмид

Уже давно известно, что перенос многих Ti-плазмид заметно активируется вблизи опухолей, индуцированных агробактериями. Опины, продуцируемые этими опухолями, индуцируют конъюгативный перенос на уровне транскрипционного фактора, узнающего систему катаболизма опинов, кодируемую Ti-плазмидами. Хотя опины контролируют непосредственно систему собственного катаболизма, регуляция конъюгации происходит опосредованно. Экспрессия *tra*-генов активируется транскрипционным регулятором и небольшими диффундирующими молекулами (вторичными мессенджерами), продуцируемыми донорной популяцией. Эта активно изучаемая система использует лактоны N-ацил-гомосерина, которые синтезируют сами бактерии для активации определенных генов. Данная сигнальная система (quorum sensing) позволяет бактериям определять численность своей собственной популяции. У *Agrobacterium* система "quorum sensing" используется для инициации экспрессии *tra*-генов тогда, когда численность популяции достигает определенного порогового уровня. Таким образом, конъюгативный перенос регулируется двумя факторами: специфическим источником питания — опином и плотностью бактериальной популяции. При этом активатор транскрипции *tra*-генов находится под контролем регулятора, реагирующего на опины. Интересно, что хотя эта система регуляции имеется у разных типов Ti-плазмид (нопалин-агроцинопиновых A+B- и октопин-маннитоловых), генетическая организация регуляторного каскада у них различна. По-видимому, эти системы возникли независимо, что говорит о важности механизма индукции переноса Ti-плазмид в рамках опинового регулона. Общим у них является механизм эксплуатации растительного метаболизма агробактериями, опосредованный синтезом и катаболизмом опинов.

IV.A. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

IV.A.1. Регуляция опинами

Указания на то, что определенные опины индуцируют конъюгацию, впервые получила Kerr (1969, 1971), которая наблюдала перенос факторов вирулентности от патогенного в непатогенный штамм *Agrobacterium* при их совместном росте в корончатом галле. Попытки осуществить такой перенос на лабораторной среде были безуспешными. Фактически данные работы явились первым указанием на само существование Ti-плазмид. Окончательное доказательство индуцибельного переноса данных плазмид было получено в изящных опытах с предварительным выращиванием донора на синтетической среде, содержащей опины (Kerr et al., 1977; Genetello et al., 1977). Затем был проведен ряд генетических работ, из которых могут быть сделаны два вывода (Farrand, 1993).

1. Для каждой плазмиды обычно лишь один из опинов является индуктором конъюгативного переноса. Например, перенос pTiC58 (нопалин-агроцинопиновая плаزمида типа A+B) индуцируется агроцинопинами A и B, но не индуцируется нопалином или другими опинами (Ellis et al., 1982b). Перенос pTi15955, pTiR10, pTiB6 (октопин-маннитоловый тип) индуцируется октопином (или другими представителями семейства, например, лизопином), но не индуцируется маннитоловыми опинами или другими семействами опинов.

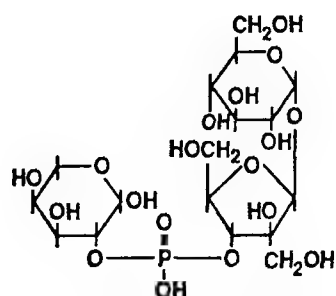
2. Конъюгативные опины активируют гены собственного транспорта и катаболизма. Уже достаточно давно показано, что катаболизм и конъюгация вызываются общими эффекторами (Petit et al., 1978; Klapwijk et al., 1978). Более того, мутанты, являющиеся конститутивными по одному из этих процессов, конститутивны и по второму (Petit, Tempe, 1978; Petit et al., 1978; Klapwijk, Schilperoort, 1979).

К настоящему времени лишь для 4 из 8 известных семейств опинов показана способность индуцировать конъюгативный перенос. Ее имеют октопиновое и нопалиновое семейство аргиниловых опинов, а также 2 фосфодизфирных класса — агроцинопины A+B и агроцинопины C+D (рис. 3). Кроме того, большинство Ti-плазмид кодирует катаболизм двух или более семейств опинов, из которых лишь одно является индуктором переноса. Это позволяет разделить Ti-плазмиды на несколько групп в зависимости от опина, стимулирующего перенос (табл. 2). Исключением является pAtK84b — Ti-подобная плазмида катаболизма опинов, которая переносится в присутствии как нопалина, так и агроцинопинов A+B (Ellis et al., 1982b). Конъюгация плазмиды, кодирующей катаболизм опинов у штамма K112 *A. radiobacter*, может индуцироваться этими же наборами опинов.

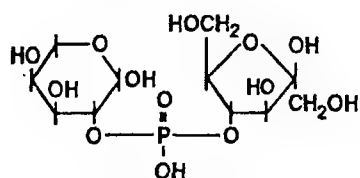
За последние годы система координированного контроля конъюгации была изучена на молекулярном уровне для нопалин-агроцинопиновых и октопин-маннитоловых Ti-плазмид. Поскольку системы катаболизма опинов подробно представлены в главе 9, здесь будут даны лишь краткие их характеристики.

Ранее было показано, что нопалин индуцирует конъюгацию хорошо изученных нопалин-агроцинопиновых плазмид — pTiC58 и pTiK27 (Kerr et al., 1977; Petit et al., 1978). Однако, позднее это оказалось неправильным: их перенос индуцируют фосфодизфирные сахара — агроцинопины A+B (рис. 3A) (Ellis et al., 1982a, 1982b). Кроме того, эти два типа опинов могут служить источниками углерода и энергии для агробактерий, содержащих соответствующую Ti-плазмиду. Оперон *acc*, контролирующий транспорт и катаболизм этих опинов, локализован на pTiC58 рядом с кластером *tra/oriT* (рис. 1). Секвенирование позволило выявить 8 генов, транскрипция которых происходит в одном направлении (рис. 4A). Продукт первого из них (*accR*) является транскрипционным репрессором, который откликается на агроцинопины A и B (Beck von Bodman et al., 1992). Следующие 5 генов кодируют периплазматические белок-зависимые транспортные системы ABC-типа, а последние два гена кодируют функции, необходимые для утилизации двух сахарофосфатных опинов в качестве единственных источников углерода (Kim, Farrand, 1997). В исходной Ti-плазмиде гены *acc* экспрессируются на относительно высоком уровне, который повышается в 5-10 раз при добавлении агроцинопинов A+B (Hayman, Farrand, 1988). Очищенный репрессор AccR

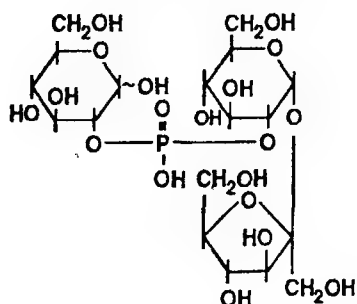
A СЕМЕЙСТВО АГРОЦИНОПИНОВ



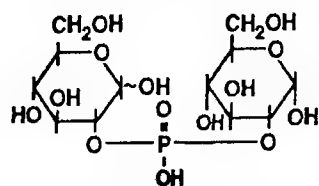
Агроцинопин А



Агроцинопин В

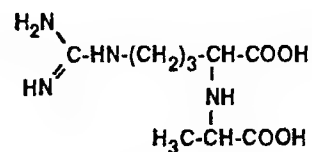


Агроцинопин С

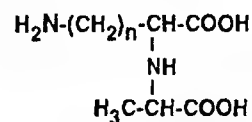


Агроцинопин D

B СЕМЕЙСТВО ОКТОПИНОВ



Октопин



n=3 октопиновая кислота

n=4 лизопин

Рисунок 3. Химические формулы конъюгативных опинов. Агроцинопины А и В индуцируют перенос Ti-плазмид нопа-лин-агроцинопинового типа, агроцинопины С и D - плазмид агропин-агроцинопинового типа, октопин и его гомологи - плазмид октопин-маннитилового типа.

связывается с цис-элементом, находящимся на 5'-конце гена *accR* (данные автора). Добавление агроцинопинов нарушает это связывание, то есть они являются истинными индукторами. Делеционные и инсерционные мутации в *accR* вызывают конститутивную экспрессию *acc*, а также конститутивный перенос Ti-плазмид. Поэтому очевидно, что репрессор AccR является основным регулятором, который контролирует одновременно катаболизм опинов и конъюгацию.

Механизм индукции конъюгации опидами несколько различается для классических Ti-плазмид октопин-маннитилового типа, таких как pTiA6, pTi15955, pTiAch5, pTiR10 и pTiB6. Индукторами переноса этих плазмид служат вещества семейства октопина: сам октопин, октопиновая кислота и лизопин (рис. 3B). Транспорт и катаболизм этих аргиниловых опинов зависит от регулона *acc*, локализованного на Ti-плазмиде (рис. 1). Как и оперон *acc* на плазмиде pTiC58, оперон *acc* тесно сцеплен с локусом *tra/oriT*. Изучение мутантов позволило предположить, что катаболизм опинов и перенос плазмиды контролируются общим репрессором (Petit, Tempe, 1978; Klapwijk et al., 1978; Klapwijk, Schilperoort, 1979). Однако позднее это оказалось неправильным: регулон *acc*, который полностью секвенирован (Valdivia et al., 1991; Zanker et al., 1992, 1994), состоит из двух противоположно считываемых групп генов (рис. 4B). Первая из них является моноцистронной и состоит из гена *occR*, продукт которого является LysR-подобным транскрипционным регулятором, активируемым в присутствии октопина (Habeeb et al., 1991; Von Lintig et al., 1991). Вторая группа состоит из 7 структурных генов катаболического пути. Первые 4 гена кодируют компоненты транспортной системы ABC-типа, следующие 2 — субъединицы октопин-оксидазы, а последний ген — орнитин-циклодиаминазу (рис. 4B). Эти 7 генов составляет единый оперон, промотор которого локализован между *occR* и *occQ* (Wang et al., 1992; Cho et al., 1997). Активация транскрипции с промотора *occQ* происходит в присутствии белка OccR и октопина (Cho, Winans, 1993). Поэтому нуль-мутации по гену *occR* приводят к неспособности катаболизировать октопин, а также к Тра-фенотипу даже тогда, когда донорные клетки выращивают в присутствии конъюгативного опида. Однако, как и другие LysR-подобные активаторы, OccR проявляет репрессорную активность: в отсутствие октопина этот белок репрессирует свой собственный ген, а также оперон *occQ* (Cho, Winans, 1993). Конститутивные по переносу мутанты Ti-плазмид октопинового типа всегда являются также конститутивными по катаболическим функциям (Petit, Tempe, 1978; Klapwijk et al., 1978; Klapwijk, Schilperoort, 1979). У этих мутантов изменены функции белка OccR, однако молекулярная основа изменений неясна. Была получена аллель *occRE23G*, которая активирует экспрессию *acc* и *tra*-регулона в отсутствие опида (Cho, Winans, 1993). При введении этой аллели в штамм дикого типа в транс-положении она оказалась доминантной и активировала конъюгацию в отсутствие октопина (Fuqua, Winans, 1996a).

IV.A.2. Регуляция путем автоиндукции

Роль опинов как ключевых сигналов, вызывающих конъюгативный перенос по крайней мере некоторых Ti-плазмид, не вызывает сомнений. Однако в этом участвует и другой транскрипционный регулятор, необходимый для экспрессии генов катаболизма. Белки AccR и OccR непосредственно регулируют гены *acc* и *occ*, а контроль оперонов *tra* и *trb* является непрямым. Первым доказательством было то, что рекомбинантный клон, содержащий слияние *lacZ* с геном *traG* на pTiC58, не экспрессируется даже в отсутствие *accR* (Piper et al., 1993). Аналогично, слияние *lacZ* с *tra*-геном плазмиды pTiR10 не активируется даже если *occR* находится в транс-положении (Fuqua, Winans, 1994). Однако, в обеих системах репортер *tra::lacZ* в транс-положении может быть активирован в рекомбинантном клоне, содержащем небольшой фрагмент, локализованный рядом с *tra/oriT*, и таким образом экспрессия *tra*-оперона регулируется путем активации. В обоих случаях путем секвенирования был выявлен один и тот же ген, названный *traR*, белковый продукт которого сходен с LuxR — транскрипционным активатором, необходимым для индукции *lux*-оперона у светящейся морской бактерии *Vibrio fischeri* (Dunlap, Greenberg, 1991; Piper et al., 1993; Fuqua, Winans, 1994). Мутации *traR* в обеих Ti-плазмидах нарушают конъюгативный перенос, а также индукцию репортера *lacZ*, слитого с *tra*- или *trb*-генами. Однако эти мутации не влияют на экспрессию генов *acc* и *occ*. Таким образом, TraR необходим для индукции *tra*-регулона обеих Ti-плазмид, но не нужен для экспрессии генов катаболизма конъюгативных опинов.

Белок LuxR и другие представители этого семейства функционируют в присутствии ко-индукторов — лактонов N-ацил-гомосерина, продуцируемых бактериями. Автоиндуктор *Vibrio* связан с lux-системой и является N-(3-оксо-гексаноил)-L лактоном гомосерина (Eberhard et al., 1981). Благодаря липофильным свойствам, эти молекулы могут свободно диффундировать между бактериальными клетками и накапливаться в среде (Kaplan, Greenberg, 1985). Эти сигналы в сочетании с белковыми активаторами транскрипции являются ключевыми элементами регуляторной системы, названной системой автоиндукции или “quorum sensing” и регулирующей экспрессию генов в зависимости от плотности бактериальной популяции (Fuqua et al., 1994). Поскольку накопление молекул автоиндуктора (АИ) в среде зависит от плотности бактериальной популяции, бактерии могут “ощущать” собственную численность по уровню АИ. Когда концентрация АИ достигает порогового уровня, он взаимодействует с LuxR или с гомологичным белком TraR. Это взаимодействие, по-видимому, переводит данные белки в состояние транскрипционных активаторов (Fuqua et al., 1994, 1996; Swift et al., 1996).

Показано, что регуляция конъюгативного переноса Ti-плазмид осуществляется определенными диффундирующими сигналами (Zhang, Kerr, 1991). Некоторые из этих плазмид, обозначенные Tra^c, могли передаваться с высокой частотой при добавлении необходимого конъюгативного опина. Другие плазмиды (Tra^{ic}) переносились в присутствии опинов со значительно меньшими частотами. Однако, при совместном культивировании штаммов, содержащих эти два типа Ti-плазмид, Tra^{ic}-плазмиды начинали передаваться с высокой частотой, что свидетельствовало об участии диффундирующего конъюгативного фактора (ДКФ) в переносе плазмид Tra^c. Показано, что ДКФ образуется в присутствии конъюгативных опинов, но не идентичен им. Использование методов спектрометрии показало (Zhang et al., 1993), что ДКФ представляет собой N-(3-оксо-гексаноил)-L лактон гомосерина, сходный с АИ *V. fischeri* (рис. 5).

Несмотря на структурное сходство, эти сигнальные молекулы обладают значительной специфичностью. Активация гена *tra::lacZ* белком TraR происходит при наномолярных концентрациях АИ агробактерий, однако требует в 1000 раз большей концентрации АИ *V. fischeri* (Zhang et al., 1993).

Синтез АИ донорными штаммами *Agrobacterium* контролируется геном *traI*, находящимся на Ti-плазмиде. Он гомологичен гену *luxI*, необходимому для синтеза АИ *V. fischeri*. У агробактерий

Таблица 2. Опины, контролирующие конъюгативный перенос плазмид *Agrobacterium*

Тип плазмид	Ассоциированные опины	Плазмиды	Опины, вызывающие конъюгацию
Нопалиновый	Нопалин Агроцинопины A+B	pTiC58 pTiK27 pTiT37	Агроцинопины A+B Агроцинопины A+B Конститутивный ¹
Октопиновый	Октопин, маннитоловые опины	pTi15955 pTiA6 pTiR10 pTiAch5 pTiB6	Октопин Октопин Октопин Октопин Октопин
Агропиновый	Маннитоловые опины, сукцинамопин, агроцинопины C+D	pTiBo542	Агроцинопины C+D
Опин-катаболизирующий	Нопалин, агроцинопины A+B	pAtK84b pAtK112	Агроцинопины A+B и нопалин

¹Перенос pTiT37 с низкой частотой возможен и без индукции опинами, но предварительная обработка донора агроцинопинами A и B значительно повышает его частоту (Ellis et al., 1983b).

данный ген является первым в *trb*-опероне на плаزمидах pTiC58 и pTiR10 (Hwang et al., 1994; Fuqua, Winans, 1994; рис. 2В). Важно, что у *V. fischeri* ген *luxI* также является первым геном в регулируемом им опероне биolumинисценции. Экспрессия *trb*-оперона зависит от активатора TraR, что делает регулируемый синтез АИ агробактерий зависимым от аутоиндукции. Это также напоминает систему *V. fischeri*, в которой продукция АИ зависит от LuxR и самого АИ, накапливаемого в результате базальной экспрессии *lux*-оперона.

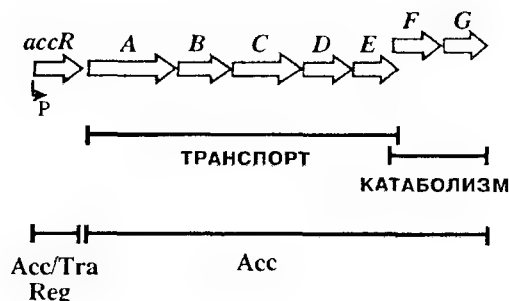
Хотя лактон гомосерина может являться продуктом промежуточного обмена (Huisman, Kolter, 1994), с использованием системы *in vitro* было показано, что очищенный белок TraI катализирует синтез этого лактона из S-аденозил-метионина и 3-оксо-октаноил-АСР. Аналогичный механизм биосинтеза АИ выявлен и у *V. fischeri* (Eberhardt et al., 1991; Schaefer et al., 1996).

Многие данные показывают, что транскрипция *trb*- и обоих *tra*-оперонов непосредственно активируется TraR. Во-первых, слияния генов *tra* и *trb* с *lacZ* активируются только при одновременном присутствии TraR и АИ (Piper et al., 1993; Hwang et al., 1994; Fuqua, Winans, 1994). Во-вторых, промоторы этих оперонов содержат близкий к совершенному инвертированный повтор, обозначенный *tra-box* размером 18 п.н. (гомологичный *lux-box* размером 20 п.н. выявлен у *V. fischeri* в промоторе *lux*-оперона). У обоих микроорганизмов делеции данных участков промотора вызывают утрату транскрипционной активности (Baldwin et al., 1989; Hwang et al., 1994; Fuqua, Winans, 1994, 1996b; Farrand et al., 1996; Cook, 1996). С использованием активной формы белка LuxR показано, что он, совместно с РНК-полимеразой, специфически связывается с последовательностью *lux-box* (Stevens et al., 1994; Stevens, Greenberg, 1997).

IV.A.3. Регуляторная иерархия

Индукция конъюгации требует наличия регуляторного опина, а также компонента системы "quorum sensing", аутоиндуктора (АИ). Для обоих типов Ti-плазмид сопряжение этих регуляторов достигается благодаря белку TraR, синтез которого регулируется опинами. В Ti-плазмидеhopалинового типа *traR* является 4-м в наборе из 5 генов, регулируемом промотором *accR-acc* (данные автора, рис. 6А). Получены данные о том, что этот промотор регулируется белком AccR в присутствии агроцинопинов. Во-первых, анализ слияний *traR-lacZ* показал его репрессию AccR и дерепрессию в отсутствие этого белка или при добавлении агроцинопинов. Во-вторых, инсерции Tn5 в гены, расположенные выше *traR*, нарушают индукцию переноса агроцинопинами. Эти мутации могут быть комплементированы фрагментом ДНК, несущим *traR* но не перекрывающим сайты инсерции. Это показывает, что фенотип Tra⁺, связанный с инсерци-

А. *acc* ОПЕРОН



В. *occ* ОПЕРОН

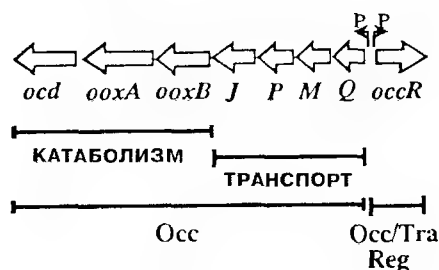


Рисунок 4. Опероны катаболизма конъюгативных опинов. *acc* (pTiC58) кодирует транспорт и катаболизм агроцинопинов А и В, *occ* (pTiR10) — октопина и его производных.

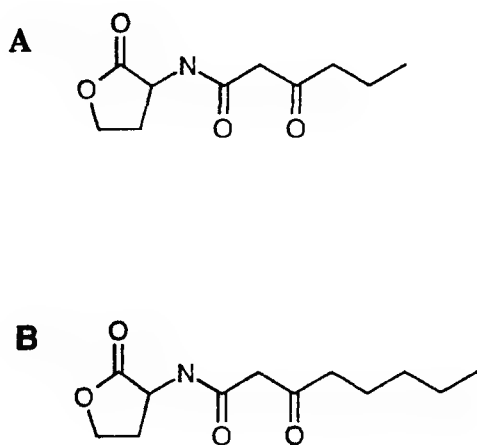


Рисунок 5. Химические структуры автоиндукторов. А — VAI (автоиндуктор *Vibrio fischeri*; лактон N-(3-оксо-гексаноил)-L-гомосерина). В — AAI (автоиндуктор *Agrobacterium tumefaciens*; лактон N-(3-оксо-октаноил)-L-гомосерина).

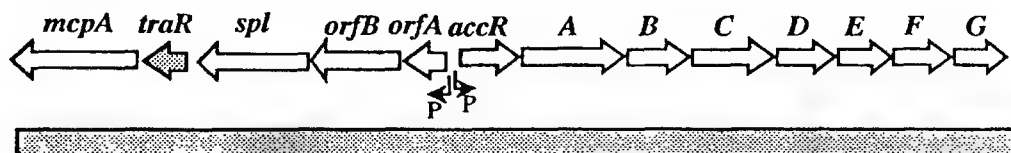
известных функций. Третий ген, названный *spl*, может кодировать белок, близкий к ферменту сахарозо-фосфорилазе, имеющемуся у некоторых бактерий (данные автора). Последний ген, локализованный сразу за *accR*, может кодировать белок, сходный с метил-акцептирующим белком хемотаксиса MscA у *Caulobacter crescentus*. Очевидно, что эти гены не связаны с выполнением функций, необходимых для конъюгации и могут участвовать в рецепции или катаболизме неизвестного субстрата. Особый интерес представляет сахарозо-дифосфорилаза, так как агроцинопины являются фосфодиэфирами арабинозы или сахарозы. Анализ последовательностей показал, что AccF кодирует фосфодиэстеразу, которая расщепляет агроцинопины на два продукта, один из которых может быть фосфорилированным сахаром (Kim, Farrand, 1997). Продукт гена *spl* может быть связан с дальнейшим метаболизмом этого продукта. Однако оперон *traR* не участвует в транспорте и катаболизме агроцинопинов, а также в их использовании в качестве источников углерода и энергии (Hayman et al., 1993; Kim, Farrand, 1997). Ген *mcpA* не участвует в хемотаксисе на агроцинопины (Kim, Farrand, 1998).

Расположение генов, ставящее *traR* под контроль *occR* в октопин-маннитоловых Ti-плазмидах, может быть разным, хотя их действие приводит к одинаковому результату. В этой системе *traR* является последним геном в опероне из 14 генов, в котором первые 7 представлены *occ* (Fuqua, Winans, 1996a; рис. 6В). Первым из генов, следующих за *occ*, является *msh*, кодирующий белок, гомологичный MetH *E. coli*, тогда как следующие 5 генов, предшествующие *traR*, могут кодировать белки, сходные с пермеазами олигопептидов ABC-типа. Однако субстрат для этой транспортной системы выявить не удалось (Fuqua, Winans, 1996a). Генетические опыты показали, что среди этих генов только *traR* необходим для конъюгации. Полярные мутации в данном регионе нарушают октопин-индуцируемую конъюгацию, а также экспрессию дистального гена *traR* (Fuqua, Winans, 1996a). Последнее нарушение может быть комплементировано путем введения гена *traR* в транс-положении. Таким образом, как и в случае плазмиды pTiC58, ген *traR* на pTiR10 находится в составе оперона, экспрессия которого контролируется регулятором (в данном случае OccR), взаимодействующим с конъюгативным опином. Соответственно, экспрессия *traR* контролируется непосредственно OccR, и анализ промотора показал, что этот конт-

ами, вызван полярным эффектом по отношению к генам, находящимся ниже *traR*. В-третьих, использование метода расширения праймера показало, что участок 6.8 т.п.н. экспрессируется как единый РНК-транскрипт с промотора, локализованного непосредственно перед *orfA* — первым геном в 5-генном кластере. И наконец AccR-регулируемая экспрессия *traR* инициируется с района, локализованного в 5'-конце *orfA*. Таким образом, фрагмент размером 245 п.н., находящийся между *accR* и *orfA*, представляет собой двусторонний промоторно-операторный комплекс, позволяющий белку AccR регулировать транскрипцию в обоих направлениях. Показано, что данный район содержит цис-активные элементы, связывающие AccR (данные автора).

До сих пор неясно, какие гены связаны с *traR*. Белковый продукт *orfA* не проявляет сходства с известными последовательностями, имеющимися в базах данных, а *orfB* гомологичен гену *yjbB Escherichia coli*. Этот ген, локализованный в участке 4.225.310 – 4.226.941 генома *E. coli* (Blattner et al., 1997), не кодирует

А. *acc-traR* locus



В. *occ-traR* locus

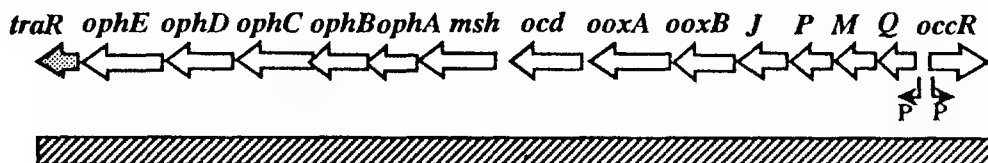


Рисунок 6. Организация *traR* и генов метаболизма конъюгативных опинов.

А – рTiC58 (плазмида нопалин-агроцинопинового типа). Оперон, содержащий *traR*, считывается в направлении, противоположном оперону, кодирующему катаболизм конъюгативных агроцинопинов А и В. Транскрипция обоих оперонов зависит от промотора *p*, репрессируемого белком AccR в присутствии агроцинопинов.

В – рTiR10 (плазмида октопин-маннитолового типа). *occR* кодирует транскрипционный активатор, взаимодействующий с промотором *p*.

роль распространяется на промотор *occQ*, находящийся на самой 5'-границе кластера генов 14 т.п.н. (Fuqua, Winans, 1996a).

Таким образом, для Ti-плазмид октопинового и нопалинового типов экспрессия *tra*- и *trb*-генов происходит с участием транскрипционного активатора TraR и связанного с ним автоиндуктора (АИ), включенного в систему “quorum sensing”. В обоих случаях конъюгация происходит с участием опинов, синтезируемых растительной опухолью. В обеих системах ген *traR* находится под контролем опинового регулятора. Интересно, что хотя перенос обеих Ti-плазмиды подчинен единому регуляторному механизму, организация генных структур, содержащих *traR*, у них различна. Таким образом, события, приводящие к включению *traR* в состав агроцинопинового регулона, не зависят от событий, приводящих к его включению в состав октопинового регулона. Это в свою очередь, показывает важность регуляции конъюгативного переноса Ti-плазмиды соответствующим опином.

Представляет интерес также и расположение *tra*- и *trb*-кластеров на различных Ti-плаزمидях. Как уже отмечалось, оперон *traI-trb* тесно сцеплен с *oriV/rep* на рTiC58 и рTiR10. Кроме того, ген *traR*, необходимый для катаболизма конъюгативного опина, на обеих Ti-плазмидях тесно сцеплен с *tra/oriT* (рис. 7). Важно, что хотя интервал *tra/oriT-traR* весьма консервативен для двух типов Ti-плазмид, опероны, содержащие *traR*, а также опероны для транспорта и катаболизма конъюгативных опинов, различаются. Интервал между *traR* и опероном *traCDG* также достаточно консервативен, что было показано при электронно-микроскопическом анализе гетеродуплексов (Engler et al., 1981).

IV.B. МОДУЛИРУЮЩАЯ ФУНКЦИЯ

Регуляторная система генов, зависящая от TraR, содержит дополнительный элемент, *traM*, который модулирует способность TraR активировать *tra*-регулон. Ген *traM* присутствует на Ti-плазмидах октопинового и нопалинового типов и в обоих случаях локализован между *traR* и *traAFB* (Hwang et al., 1995; Fuqua et al., 1995; рис. 7). Мутации в этом гене приводят к опин-независимому конститутивному переносу Ti-плазмиды. Однако эти мутации не влияют на экспрессию *acc* и *ocs*, что говорит об отсутствии влияния TraM на первичные регуляторы AccR и OcsR. Поэтому на фоне мутаций в генах *accR* и *ocsR* дополнительная мутация в *traM* приводит к резкому повышению частоты конъюгативного переноса. При этом TraM не участвует непосредственно в регуляции *tra*-регулона или гена *traR* (Hwang et al., 1995; Fuqua et al., 1995).

Эффект TraM зависит от уровня его экспрессии и при его повышении может наблюдаться ингибирующий эффект. В то же время, когда *traR* экспрессируется более активно, чем *traM*, такого ингибирования не наблюдают (Hwang et al., 1995; Fuqua et al., 1995). Это показывает, что белок TraM ингибирует функцию TraR, возможно путем непосредственного взаимодействия с этим транскрипционным активатором. Поэтому ингибирующий эффект TraM не может быть преодолен при избытке АИ, если баланс этих двух компонентов не сдвинут в пользу TraM (Zhang, Kerr, 1991; Hwang et al., 1995; Fuqua et al., 1995). Использование дрожжевой дигибридной системы показало, что белки TraM и TraR могут взаимодействовать (данные автора). Более того, мутации в гене *traM*, которые нарушают эффект подавления конъюгации, нарушают и это белок-белковое взаимодействие.

В других известных системах типа “quorum sensing” гомологи белка TraM отсутствуют, хотя гомолог гена *traM* выявлен при секвенировании плазмиды pNGR234a. Белок TraM не влияет на LuxR-зависимую активацию *lux*-оперона и LasR-зависимую активацию гена *lasB* (данные автора). Таким образом, данный анти-активатор уникален для *tra*-системы.

IV.C. БИОЛОГИЯ РЕГУЛЯТОРНОЙ СИСТЕМЫ

Системы “quorum sensing”, основанные на LuxR-подобном транскрипционном регуляторе и сигнале-АИ, обеспечивают бактериям способность воспринимать плотность собственной популяции и в соответствии с ней активировать определенные гены. Добавление АИ в среду может вызвать преждевременную индукцию, что показано для *tra*-генов. При индукции опинами перенос начинается после значительного лаг-периода (Fuqua, Winans, 1994). Использование *lacZ*-репортера показало, что этот лаг-период связан с задержкой транскрипции *tra*-регулона. Анализ предложенной модели показал, что эта задержка может быть уменьшена, если АИ и конъюгативный опин добавить в культуру одновременно (Fuqua, Winans, 1994). В соответствии с этим доноры, способные к конъюгативному переносу благодаря мутации в гене опин-регулируемого белка, вырабатывают индуцируемый уровень опинов. Кинетика индукции у этих мутантов такая же, как у исходных штаммов при одновременном добавлении конъюгативного опина и АИ.

Эти результаты соответствуют модели (рис. 8), согласно которой конъюгативный перенос Ti-плазмиды зависит от размера популяции донора. Однако этот параметр не является существенным: конъюгация регулируется опинами, что свидетельствует о важности трофического фактора для активации системы. В отсутствие опинов гены их катаболизма репрессированы. Поскольку *traR*-оперон контролируется первичным опиновым регулятором, транскрипционный активатор, требуемый для экспрессии *tra*-регулона, также отсутствует. Для плазмиды pTiC58 этот контроль осуществляется путем репрессии, а для плазмид типа pTiR10 — путем активации. Однако это приводит к одинаковому результату: в отсутствие конъюгативного опина *traR* не экспрессируется на уровне, достаточном для активации *tra*-регулона. Более того, поскольку для активации оперона *traI/trb* необходим белок TraR, эти бактерии продуцируют очень мало АИ в отсутствие конъюгативного опина.

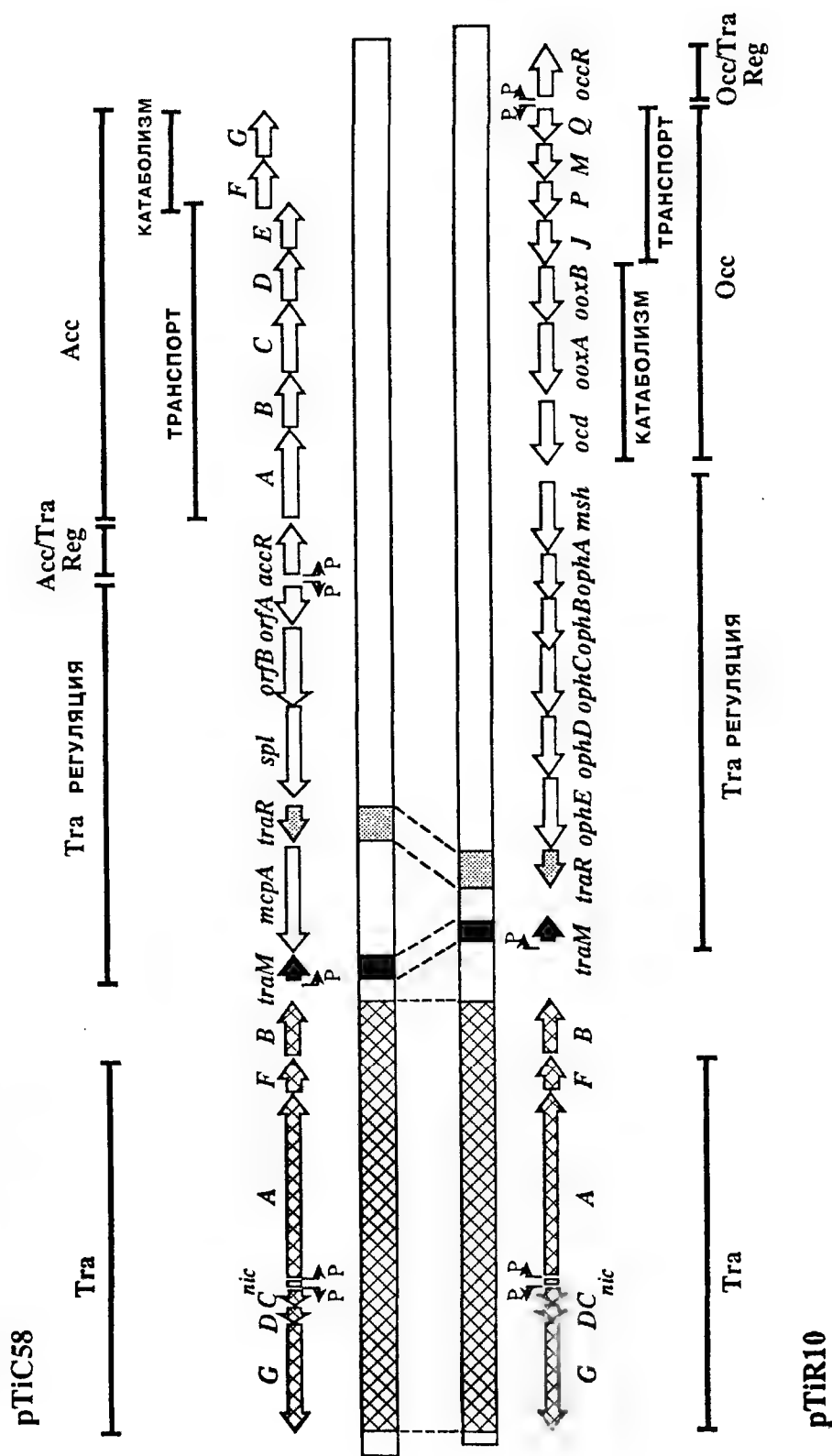


Рисунок 7. Сопоставление *tra* и *tra*-регуляторных оперонов Ti-плазмид двух типов (гомологичные гены заштрихованы). Сегменты, соединенные пунктирными линиями, соответствуют району высокой гомологии C, выявленному путем анализа гетеродуплексов (Engler et al., 1981).

В присутствии конъюгативного опина происходит его поглощение бактериями, после чего он может взаимодействовать с транскрипционным эффектором. Это приводит к дерепрессии в случае генов *acc* и к активации в случае *oss* соответствующих оперонов катаболизма опинов, а также оперона *traR*. Синтезируемый в результате этого белок TraR остается неактивным до тех пор, пока в среде не накопится достаточное количество АИ, что зависит от интенсивности клеточного роста. Когда это происходит, TraR активирует транскрипцию *tra*-регулона и начинается конъюгативный перенос Ti-плазмиды.

Какова при этом роль антиактиватора TraM? Для обоих типов Ti-плазмид мутации в гене *traM* приводят к конститутивному переносу, независимому от опинов, т.е. даже в неиндуцирующих условиях образуется количество белка TraR, достаточное для активации *tra*-регулона. Возможно, что в отсутствие конъюгативных опинов уровень TraM является избыточным по отношению к TraR и взаимодействие этих белков не позволяет TraR связываться с АИ. Возможно и то, что белок TraM взаимодействует с комплексом TraR-АИ, что предотвращает его связывание с промоторами *tra* и *trb*. В соответствии с этой моделью, после индукции конъюгативным опином TraR достигает уровня, избыточного по отношению к TraM. Поэтому свободный белок TraR связывается с АИ, после чего активируется транскрипция промоторов *tra* и *trb*. Вне зависимости от механизма, модель предполагает, что *traM* предотвращает преждевременную конъюгацию, которую мог бы обеспечивать базальный уровень экспрессии *traR*.

Сходство регуляторных систем у данных типов плазмид показывает, что для конъюгации необходимы два условия. Присутствие опина показывает, что в среде имеется источник питания, доступный для бактерий. Роль механизма "quorum sensing" менее ясна. Возможно, что при одновременной индукции конъюгации во всей донорной популяции расширяется круг реципиентов, в которые может быть перенесена Ti-плазида. Важным для биологии агробактерий является то, что Ti-плазида "узнает" опухоль как экологическую нишу, для освоения которой необходима ее экспрессия.

IV.D. TRAR, СВЯЗАННЫЙ С ДРУГИМИ СИСТЕМАМИ

Гомологи *traR* связаны и с другими опиновыми системами. На плазмиде pTi15955 аллель этого гена сцеплена с генами, контролирующими транспорт маннопина (Oger et al., 1998). Гомолог, обозначенный *trlR*, транскрибируется совместно с 4 вышележащими генами, кодирующими перенос плазмиды pTiR10 (Zhu, Winans, 1998). Данная аллель представляет собой мутацию типа "сдвига рамки считывания" аллели *traR*, возникшую за счет делеции АТ-пары в положении 542. Таким образом, различие между этими двумя аллелями затрагивает карбокси-терминальные домены их белковых продуктов. Сопоставление с белком LuxR показывает, что этот домен может играть роль во взаимодействии белка с ДНК. Поэтому не удивительно, что при росте на среде с маннопином происходит активация *trlR*, но это не вызывает перенос Ti-плазмиды. В то же время, экспрессия *trlR* ингибирует активируемый опинами конъюгативный перенос pTi15955 и pTiR10 (Oger et al., 1998; Zhu, Winans, 1998). Этот эффект обусловлен супрессией оперонов *tra* и *trb*. Однако TrlR не подавляет экспрессию регулируемого октопином гена *traL*, находящегося на этой Ti-плазмиде. Поскольку LuxR функционирует в форме гомомультимера, очевидно, что *trlR* является доминантно-негативной аллелью *traR*. Предполагается, что при экспрессии обоих генов белки TrlR и TraR взаимодействуют между собой и формируют гетеромультимеры.

Выявление второго *traR*-подобного гена на Ti-плазмидах октопин-маннитилового типа показало необходимость изучения различных Ti-, Ri- и опин-катаболизирующих плазмид на наличие гомологов этого регуляторного гена (Oger et al., 1998). Использование метода Саузерн-гибридизации показало, что некоторые плазмиды *Agrobacterium*, включая pTiC58, содержат более одной последовательности, гомологичной *traR*. В то же время, другие Ti-плазмиды, например pTiBo542 и близкая к ней pTiChry9 содержат лишь одну копию данного гена. Он выявлен и на двух плазмидах, контролирующих катаболизм опинов у неродственных штаммов *A. radiobacter*. Это показывает, что регуляция опинами конъюгативного переноса посредством системы *traR*-АИ не ограничена Ti-плазмидами. Хотя ни один из *traR*-содержащих фрагментов еще не был секвенирован, очевид-

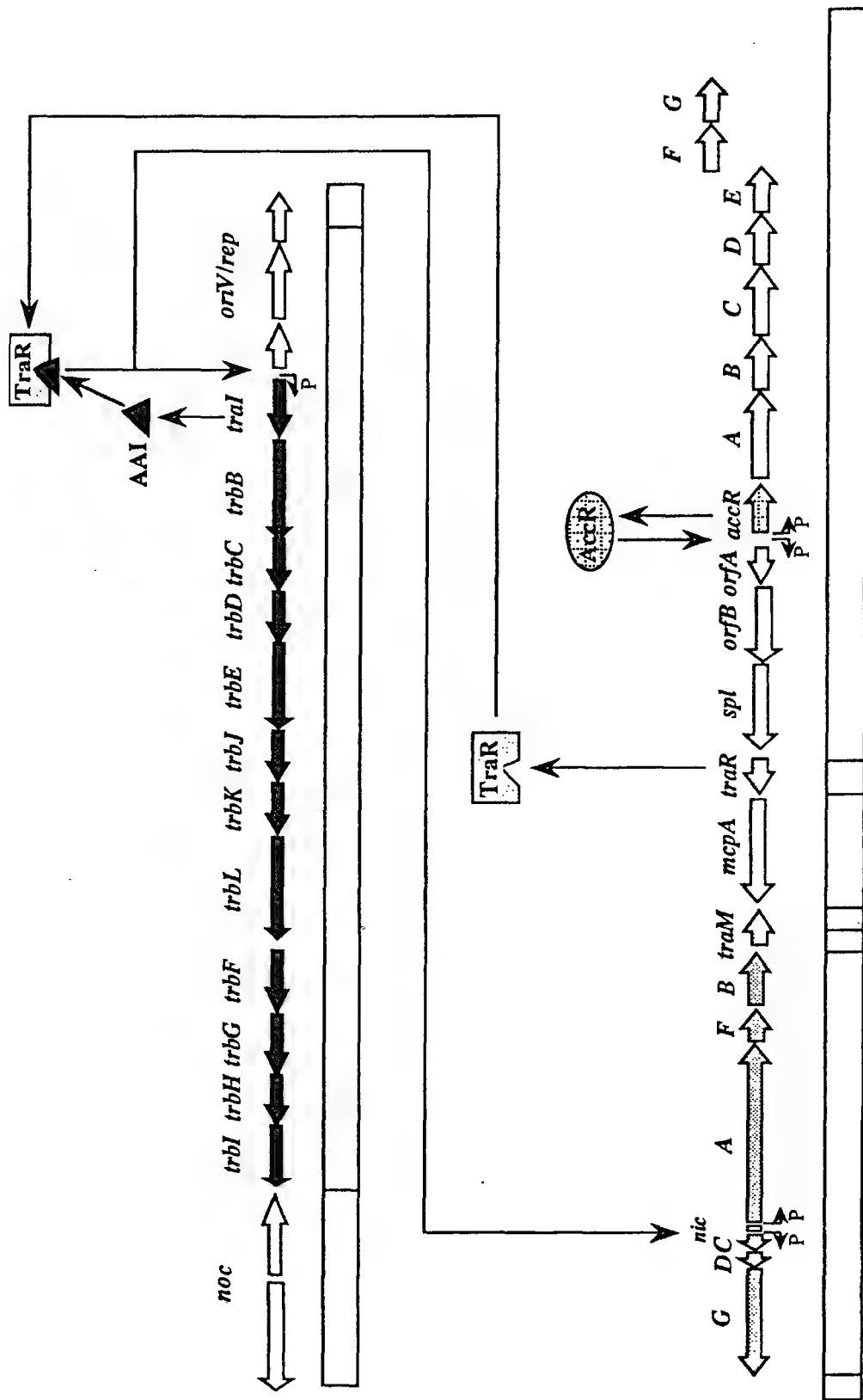


Рисунок 8. Иерархия генов *tra*-регулона, кодируемых по механизму quorum sensing (плазмиды pTC58). В отсутствие конъюгативного опина AccR репрессирует *acc* и *traR*. Опероны *traAFB* и *traCDG* не экспрессируются в отсутствие конъюгативных опinov. *traI/trb* экспрессируется на низком уровне, обеспечивающем базальную концентрацию аутоиндуктора. Опины взаимодействуют с AccR, что нарушает его связь с промотором *traR/acc*. Это приводит к дивергентной транскрипции двух оперонов, приводящей к синтезу TraR. При достижении порогового уровня аутоиндуктор взаимодействует с TraR, который активирует *tra*-опероны.

но, что Ti-плазмиды содержат несколько копий гена *traR*, которые могут быть связаны с разными опиновыми системами. Интересно, что проба на *traR* не гибридизуется с pRiA4 — плазмидой агропин-агроцинопинового типа. Это согласуется с данными об отсутствии на данной плазмиде генов *tra* и *trb* (раздел III).

Весьма интересно присутствие нескольких генов *traR* на плазмиде pAtK84b штамма *A. radiobacter* K84. Эта плазида кодирует катаболизм нопалина и агроцинопинов А и В. Хотя данная плазида сходна с pTiC58, она не несет *vir*-генов и Т-ДНК (Clare et al., 1990). Однако на ней выявлены участки, гомологичные оперонам *tra* и *trb* плазмиды pTiC58. Сходство с этой плазмидой усиливается и возможностью индукции ее конъюгативного переноса агроцинопинами А и В (Ellis et al., 1983b). Однако, в отличие от pTiC58, конъюгация pAtK84b индуцируется нопалином. Возможно, что два фрагмента pAtK84b, гомологичные гену *traR*, связаны с катаболизмом нопалина и агроцинопина.

Остается непонятным, как ген *traR* вошел в состав системы катаболизма опинов. На уровне нуклеотидных последовательностей охарактеризованы 3 копии этого гена (Fuqua, Winans, 1996; Oger et al., 1998). Во всех случаях обнаружены последовательности из 100-200 пар нуклеотидов между *traR* и окружающими его генами, однако доказательств участия в его перестройках IS-последовательностей получено не было. Не выявлено сходства в межгенных последовательностях, расположенных у 5' и 3'-концов *traR* в различных оперонах.

Ген *traR* не является специфичным лишь для рода *Agrobacterium*. Большинство генов *tra*-регулона имеет гомологов на плазмиде pNGR234a, и в их число входят гены *traR* и *traM* (Freiberg et al., 1997). Остается неясным, участвуют ли они в переносе pNGR234a, однако это весьма вероятно. На этой плазмиде выявлен также ген *traI*, связанный с *trb*-опероном, и показано, что штамм NGR234 синтезирует АИ, хотя и не такой, как агробактерии (Freiberg et al., 1997). Более того, на данной *sum*-плазмиде локусы *traI/trb* и *oriV/rep* тесно сцеплены, что характерно и для Ti-плазмид. В то же время, на pNGR234a ген *traR* является моноцистронным, что согласуется с данными о конститутивном проявлении способности этой плазмиды к переносу. Важно выяснить, регулируется ли ее перенос по механизму “quorum sensing”, как это характерно для Ti-плазмид.

Показано, что *sum*-плазида штамма CFN42 *R. etli* содержит вблизи локуса *otiV/rep* последовательность, гомологичную *traI* (Ramirez-Romero et al., 1997). Этот штамм продуцирует вещества, обладающие аутоиндукторной активностью (Rosemeyer et al., 1998). Важно отметить, что *traI* отвечает за синтез АИ и является первым геном в *trb*-опероне. Более того, локусы *traI/trb* и *oriV/rep* тесно сцеплены на *sum*-плазмиде *R. etli*, как и на других плазмидах. Это показывает, что регуляторная система *traR/traI*, работающая по принципу “quorum sensing”, является еще одной общей генной системой для крупных плазмид Rhizobiaceae (подробнее см. раздел VII).

V. Характеристики конъюгативного переноса Ti-плазмид

В самых общих чертах *tra*-система Ti-плазмид сходна с таковыми для F-фактора или RP4. Однако, многие детали работы этой системы, отличающие Ti-плазмиды от других плазмид, стали ясными лишь в самые последние годы.

V.A. УСЛОВИЯ СРЕДЫ

Помимо сигнальных молекул, индуцирующих конъюгативный перенос, выявлен целый ряд влияющих на него факторов среды. Уже давно известно, что перенос pTiB6 является температуро-чувствительным. Частота переноса этой плазмиды высока при 27°C, но резко снижается при 33°C (Tempe et al., 1977). Однако это свойство является специфичным для данной Ti-плазмиды, поскольку для других Ti-плазмид, включая pTiA6, высокая частота переноса сохраняется при 35°C. Достаточно широкий температурный диапазон переноса Ti-плазмид сочетается с узким диапазоном переноса Т-ДНК посредством системы *vir*-генов. *vir*-зависимая мобилизация RSF1010 наиболее активно происходит при 22°C, но становится не детектируемой при 29°C

(Fullner, Nester, 1996). Эти данные показывают, что *vir*-гены не требуются для полного проявления функций *tra*-системы.

Конъюгативный перенос рTiA6 активно происходит при pH=5.9-7.7, однако его интенсивность резко падает при pH<5.9. Механизм этого эффекта неясен, однако он свидетельствует о существенных различиях в работе двух систем переноса, так как *vir*-зависимая система функционирует лишь при pH<5.75, то есть в условиях полного ингибирования *tra*-системы. Эти различия отражают тот фундаментальный факт, что перенос плазмид между разными штаммами агробактерий и перенос Т-ДНК из агробактерий в растение происходят в совершенно разных условиях.

Перенос октопин-маннитоловых Ti-плазмид индуцируется на минимальной среде, содержащей необходимый опин, но на богатой среде перенос подавлен даже в присутствии опина (Нооукаас et al., 1979). Основа этого различия неясна, однако показано, что сильным ингибирующим эффектом обладают серо-содержащие аминокислоты метионин и цистеин. Учитывая, что S-аденозин-метионин является предшественником синтеза АИ (More et al., 1997), казалось логичным предположить, что метионин и цистеин могут влиять на синтез сигнальных молекул, но недавние исследования не подтвердили эту гипотезу.

V.B. СУБСТРАТ ДЛЯ СКРЕЩИВАНИЯ

Перенос некоторых бактериальных плазмид наиболее эффективно происходит на твердой среде, тогда как другие функции с равным успехом осуществляются в жидких и на твердых средах. Большинство работ по переносу плазмид Rhizobiaceae выполнено на твердых средах или на мембранах. В наших исследованиях перенос рTiC58 в жидких средах не происходил, а наблюдался лишь на твердой среде. По-видимому, это связано с тем, что для агробактерий типичным является существование на твердых субстратах — в почве, на корнях или в корончатых галлах.

Показано, что активация *tra*-генов, находящихся на рTiR10, наиболее активно происходит именно на твердом субстрате (Fuqua, Winans, 1994). В то же время, для плазмид рTi15955 и рTiC58 не выявлено различий в активации *tra*-генов и частотах переноса на твердых и в жидких средах (Oger et al., 1998).

V.C. ПОВЕРХНОСТНОЕ ИСКЛЮЧЕНИЕ

Некоторые плазмиды, находясь в клетке, предохраняют ее от проникновения второй плазмиды, что обусловлено свойством, обозначенным как поверхностное исключение (ПИ). Оно является специфичным и обычно распространяется лишь на родственные плазмиды. Ранее ПИ не было показано для октопиновых и нопалиновых Ti-плазмид. Однако Ti-плазмиды содержат в *trb*-локусе ген *trbK*, имеющийся на RP4, где он участвует в контроле ПИ (Haase et al., 1996). Клонированный ген *trbK* из рTiR10 не вызывает ПИ у штаммов агробактерий. Зрелый белок TrbK, кодируемый RP4, ацилирован по N-терминальному цистеиновому остатку, тогда как TrbK, кодируемый плазмидой рTiR10, вообще лишен этого остатка, что и может быть связано с его неспособностью осуществлять ПИ (Alt-Morbe et al., 1996).

В наших исследованиях показано, что плаزمида рTiC58 контролирует собственное ПИ, и в меньшей степени ПИ рTi15955. В то же время, вторая из этих плазмид не обуславливает ПИ первой (Нооукаас et al., 1980; Alt-Morbe et al., 1996). Белок TrbK, кодируемый рTiC58, лишен N-концевого цистеинового остатка, который не является абсолютно необходимым для ПИ. При мутациях по этому остатку белка TrbK плазмиды RP4, ПИ становится менее активным, но полностью не утрачивается (Haase et al., 1996). В данных работах также показано, что TrbK RP4 содержит N-концевой секреторный сигнал, ассоциированный с наружной цитоплазматической мембраной. Возможно, что этот сигнал важен для транспорта белка через периплазму, тогда как липидная часть обеспечивает его закрепление на наружной поверхности внутренней мембраны. Анализ последовательностей показал, что Trb-белки рTiC58 и рTiR10 содержат такой сигнал, однако не была установлена локализация данных белков в клеточной стенке бактерий.

Ген *trbK* не является строго консервативным для октопиновых и нопалиновых Ti-плазмид. Это может объяснить неполное ПИ для плазмид pTiC58 и pTi15955. Еще меньшее сходство наблюдается между этими генами для Ti-плазмид и RP4, что согласуется с данными об отсутствии для них ПИ. Лocus *trb* pNGR234a также содержит гомолог *trbK*, однако его последовательность сильно отличается от таковой для Ti-плазмид или RP4.

Эффективность ПИ для pTiC58 на несколько порядков ниже, чем для RP4. Это согласуется с данными о сильных различиях последовательностей генов *trbK* у Ti-плазмид и pNGR234a и свидетельствует о том, что ПИ не является важным для биологии системы. Интересно, что ПИ pTiC58 зависит от индукции конъюгативного переноса, то есть без активации системы конъюгации ПИ pTiC58 или pTiR10 не проявляется вообще (данные автора). Однако мутации, приводящие к конститутивному переносу pTiC58, приводят и к ПИ. Таким образом, в естественных условиях при индукции *tra*-генов система ПИ исключает перенос Ti-плазмид между разными донорами. Однако, бактерии, содержащие Ti-плазмиду, могут приобретать дополнительную Ti-плазмиду в условиях репрессии *tra*-системы. Такие условия могут создаваться вблизи опухоли, которая не вырабатывает опинов, активирующих перенос Ti-плазмиды у потенциального штамма-реципиента.

V.D. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К БАКТЕРИОФАГАМ

Некоторые бактериофаги могут инфицировать лишь клетки, содержащие конъюгативные плазмиды. Например, фаги PRD1 или PRR1 образуют зоны лизиса только на газонах бактерий, содержащих плазмиды групп IncP, IncN или IncW. Обычно эти фаги узнают компоненты Mrf-системы бактерий, которые используются для прикрепления и проникновения. Показано, что белки TrbC, TrbE и TrbL, кодируемые плазмидой RP4, наиболее важны для инфицирования PRD1 (Grahm et al., 1997). Учитывая тесное родство *trb*-генов Ti-плазмид и плазмид группы IncP1, было логичным предположить, что этот фаг должен инфицировать агробактерии. Однако экспериментально этого показать не удалось даже для штаммов, содержащих варианты pTiC58, способные к конъюгативному переносу (данные автора). Более того, не было выявлено и прикрепления фагов к поверхности клеток агробактерий. В то же время, при введении в агробактерии RP4 они становились чувствительными к фагам. Таким образом, отсутствие чувствительности к фагам у агробактерий, несущих Ti-плазмиду, не является результатом неспособности фага к репликации или созреванию. По-видимому, структуры конъюгативного мостика RP4 и Ti-плазмид не являются достаточно сходными для того, чтобы обеспечить адсорбцию фаговых частиц.

V.E. КРУГ ХОЗЯЕВ ПРИ КОНЬЮГАЦИИ

Известно, что многие системы конъюгативного переноса малоспецифичны, причем спектр их действия ограничивает не перенос, а репликация. Спектр бактерий, в которых возможна репликация Ti-плазмид, достаточно узок и ограничен сем. Rhizobiaceae. Ti-плазмиды могут переноситься и стабильно поддерживаться в разных видах *Rhizobium* (Hooykaas et al., 1977). При этом рекомбинанты часто проявляют признаки, кодируемые Ti-плазмидами. Перенос этих плазмид в другие бактерии обычно не приводит к формированию стабильных рекомбинантов. Однако это связано главным образом с неспособностью плазмид к репликации в реципиенте, так что спектр бактерий, в которые возможен перенос Ti-плазмид, может быть достаточно широк.

С использованием метода зиготической индукции показано, что pTiB6 может переноситься в *E. coli* (Sprinzl, Geider, 1988). Об этом говорят следующие дополнительные данные. Во-первых, полноразмерные Ti-плазмиды могут мобилизовать перенос рекомбинантных плазмид широкого спектра хозяев, содержащих *oriT* Ti-плазмиды, из агробактерий в *E. coli* (Cook, Farrand, 1992). Более того, этот перенос требует наличия именно *tra/oriT* и *trb*-функций Ti-плазмиды: предложенная бинарная система (Cook et al., 1997) обеспечивает перенос компонента *tra/oriT* в *E. coli* и *Pseudomonas fluorescens* с такими же частотами, как и в *Agrobacterium*. Во-вторых, Ti-плазмиды, маркированная Tn5, переносит этот транспозон в *E. coli* и *P. fluorescens* (данные автора). При этом

Ti-плазида ведет себя как вектор-самоубийца, являющийся донором транспозона, который обеспечивает его случайные встройки в геном реципиента. Скрещивания с *P. fluorescens* обеспечивают получение трансконъюгантов с низкой частотой, однако при этом канамицин-устойчивые транспозанты возникают с высокой частотой. Большинство из них не может быть затем рекультивировано на среде с антибиотиком, и лишь некоторые проявляют признак устойчивости. Это показывает, что Ti-плазида способна лишь к ограниченной, abortивной репликации в псевдомонадах. Редко возникающие канамицин-устойчивые клоны образуются за счет переноса транспозона из плазмиды в геном реципиента.

VI. Системы конъюгативного переноса других плазмид

VI.A. КОНЪЮГАТИВНЫЙ ПЕРЕНОС pAgK84

Плазида pAgK84 кодирует синтез агроцина 84, является конъюгативной, а несущий ее штамм K84 *A. radiobacter* может быть использован для биоконтроля патогенных агробактерий. Генетический анализ показал, что конъюгативность плазмиды контролируется участком 3 т.п.н. (Farrand et al., 1985, 1992). Для других конъюгативных плазмид грам-отрицательных бактерий размер этого участка в несколько раз больше: только гены, кодирующие Mpf-функции, занимают 8-12 т.п.н. Возможно, что pAgK84 не является полностью самотрансмиссивной. Однако, если для ее переноса необходим мобилизующий элемент, то он очевидно не зависит от плазмид pAtC58, pTiC58 или pAtK84b. Эта агроциновая плазида может переноситься из штаммов типа C58, лишенных pAtC58 и pTiC58, а также из производных K84, лишенных pAtK84b (Farrand et al., 1985).

Нельзя исключить, что pAgK84 содержит новый тип системы переноса, однако это маловероятно. Мы идентифицировали по меньшей мере 2 гена, гомологичные *traI/virD2* и *traG/virD4*. Первый из них кодирует сайт-специфическую эндонуклеазу, которая никерирует сайт *otiT*. Второй, возможно, кодирует Mpf-белок, ответственный за взаимодействие релаксосомы с конъюгативным мостиком. Таким образом, наиболее вероятно, что pAgK84 содержит обычную систему конъюгации. Однако эта плазида может быть лишена генов, кодирующих образование конъюгативного мостика, и тогда ее перенос зависит от наличия других трансмиссивных репликонов. Возможно и то, что pAgK84 кодирует собственные Mpf-функции. Однако в этом случае необходимо объяснить, почему все инсерции Tn5, нарушающие конъюгацию, локализуются в участке размером 3 т.п.н. (Farrand et al., 1985). Возможно, что необходимые конъюгативные Drt- и Mpf-функции дублируются дополнительными генами, имеющимися у агробактерий.

Практический интерес этих работ состоит в том, что штамм K84 широко используется для биоконтроля патогенных агробактерий (Farrand, 1991), синтез агроцина 84 является наиболее важным для выполнения этой функции. Плазида pAgK84 кодирует не только синтез агроцина 84, но и устойчивость к нему, и поэтому ее перенос в другие почвенные бактерии может снизить эффективность биоконтроля. В полевых условиях был зарегистрирован перенос pAgK84 в патогенные агробактерии, которые в результате теряли чувствительность к агроцину (Vicedo et al., 1993; Stockwell et al., 1996). Имеются и данные о том, что применение штамма K84 в районах, где его вносили ранее, оказывается неэффективным. В связи с этим был сконструирован делеционный вариант pAgK84, обозначенный K1026 и лишенный способности к переносу (Jones et al., 1988). Биоконтрольная активность у этого мутанта не меньше, чем у исходной плазмиды, а перенос в другие бактерии в полевых условиях отсутствует.

VI.B. ДРУГИЕ КРУПНЫЕ ПЛАЗМИДЫ *AGROBACTERIUM*

Многие штаммы *A. tumefaciens* несут эпигенетические элементы, значительно превосходящие по размеру Ti-плазмиду. Функции большинства из этих плазмид не удалось выявить, и их считают криптоическими. Недавно было показано, что некоторые из этих плазмид кодируют катаболизм веществ Амадори, которые содержат деоксифруктозу и глутамин, а также опины семейства хризо-

пинов (Kim, Farrand, 1996). Штамм C58 содержит плазмиду такого типа, обозначенную pAtC58 и имеющую размер около 450 т.п.н. Ее дериват, несущий встройку TnI, является самоконъюгативным (van Montagu, Schell, 1979). Более того, данная плазида может обеспечивать низкочастотный перенос RSF1010 (Cook, Farrand, 1992).

VI.C. ПЛАЗМИДЫ КАТАБОЛИЗМА ОПИНОВ

Многие природные штаммы агробактерий не образуют опухоли, но катаболизируют опины. Во всех изученных случаях эти штаммы несут большие плазмиды, кодирующие это свойство. Одна из них, pAtK84b, является самоконъюгативной. Использование метода Саузерн-гибридизации позволило выявить на ней локусы *tra/oriT* и *trb/rep-oriV* (Clare et al., 1990). Возможно, что эти локусы и определяют конъюгативность плазмиды. Кроме того, она содержит два фрагмента ДНК, гибридирующихся с *traR* (Oger et al., 1998). Поскольку перенос pAtK84b индуцируется нопалином, а также агроцинопинами А и В, возможно, что эта плазида содержит два опин-регулируемых гена *traR*.

Многие агропиновые штаммы *A. rhizogenes* содержат, в дополнение к Ri-плазмиде, дополнительную крупную плазмиду. В штаммах А4 и 15834 она кодирует катаболизм опин, синтезируемых в волосатых корнях, образование которых вызвано данным штаммом (Petit et al., 1983). Плазмиды этого типа являются самоконъюгативными, а возможно, способны мобилизовать перенос Ri-плазмид. У штамма А4 *A. rhizogenes* плазида pAgA4a кодирует катаболизм агроцинопинов А и В, которые обеспечивают перенос нопалин-агроцинопиновой Ti-плазмиды, а также pAtK84b (Petit et al., 1983; Hayman, Farrand, 1988).

VI.D. ПЛАЗМИДЫ УСВОЕНИЯ ТАРТРАТА

Многие штаммы *A. vitis* могут использовать тартрат как единственный источник углерода. У некоторых штаммов это свойство кодируется Ti-плазмидой, а у других штаммов — дополнительной крупной плазмидой. Во втором случае выявленные плазмиды были самоконъюгативными, причем частота их переноса в корончатых галлах выше, чем на агаризованной среде (Szegedi et al., 1992). Возможно, что их перенос, как и перенос Ti-плазмид, индуцируется опинами.

VI.E. ДРУГИЕ ТРАНСМИССИВНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ

Многие данные показывают, что геном *Agrobacterium* содержит одну или несколько плазмид, которые могут переноситься при конъюгации. Показано, что мутант штамма C58 *A. tumefaciens*, лишенный pTiC58 и pAtC58, мобилизует перенос pDSK519 (дериват RSF1010) с низкой, но детектируемой частотой (Cook, Farrand, 1992). Поскольку этот мутант не содержит плазмид, очевидно, что штамм C58 содержит в хромосоме конъюгативный элемент, независимый от pTiC58 или pAtC58.

Существование таких элементов было доказано при изучении pTiA6NC, не способной к конъюгации и лишенной гена *trbI* (Alt-Morbe et al., 1996). Однако, при введении многокопийной плазмиды, содержащей ген *traR*, наблюдали перенос pTiA6NC, хотя и с низкой частотой (Alt-Morbe et al., 1997). Гомолог гена *trbI*, находящийся на RP4, важен для переноса этой R-плазмиды (Haase et al., 1995) и возможно, что продукт этого гена играет существенную роль и в переносе Ti-плазмид. Возможно, что нарушение *traI* на плазмиде pTiA6NC компенсируется другими, еще не известными генами, контролирующими конъюгацию.

В работах других авторов (Cho et al., 1997) показано, что октопин-маннитолиновая плазида штамма R10 *A. tumefaciens* может переносить маркеры *arcAB* и *putA*, связанные с катаболизмом аргинина и пролина. Этот перенос зависит от Ti-плазмиды и индуцируется октопином. В то же время, данные гены локализованы не на Ti-плазмиде, а на линейном элементе ДНК (pAtR10b). Гибридационный анализ показал, что данный элемент присутствует также в штамме C58. Ана-

логичные данные получены для плазмиды pTiR10, которая обеспечивала перенос генов хромосомы (Dessaux et al., 1989). Однако в последнем случае переносу подвергались лишь некоторые маркеры, в том числе *arcAB* и *putA*. Данный линейный элемент может мобилизоваться для переноса Ti-плазмидой и при этом не имеет сходства с линейной хромосомой (2100 т.п.н.), характерной для агробактерий (Ajjardet-Servent et al., 1993).

VII. Биологическое значение

Феномен конъюгативного переноса важен с точки зрения как структуры и эволюции самих плазмид, так и биологии *Rhizobiaceae*, так как он обеспечивает поддержание генетического разнообразия бактерий.

VII.A. ПОДДЕРЖАНИЕ ПЛАЗМИД

Проблема поддержания плазмид должна рассматриваться на уровне как популяции, так и всего бактериального вида, и она тесно связана с их способностью к конъюгативному переносу. В первом случае сохранение плазмид обеспечивается путем горизонтального переноса внутри популяции. Во втором случае – путем переноса в другие виды. В случае *Rhizobiaceae* второй аспект весьма важен, так как горизонтальный перенос плазмид между ризобиями и агробактериями дает возможность “апробации” разных сочетаний плазмид и хромосом и выбора тех из них, которые обеспечивают наибольшую приспособленность бактерий. Многочисленные данные указывают на то, что Ti-, Ri-, *sym*-, а также криптические плазмиды могут достаточно широко переноситься между различными видами *Rhizobiaceae* в естественных условиях (Kerr, 1969, 1971; Schofield et al., 1987; Pretorius-Guth et al., 1990; Kinkle, Schmidt, 1991; Rao et al., 1994). Важно, что в почвах обычно присутствует большое количество невирулентных (лишенных Ti-плазмид) штаммов агробактерий, которые могут представлять собой потенциальный резерв реципиентов. Многие из этих штаммов весьма сходны с быстрорастущими ризобиями (Willems, Collins, 1993; Sawada et al., 1993). Поэтому можно предположить, что такие штаммы могут служить реципиентами и для *sym*-плазмид. Таким образом, если невирулентный штамм приобретает Ti-плазмиду, он превращается в *A. tumefaciens*, а если приобретает *sym*-плазмиду, то превращается в *Rhizobium*.

VII.B. ЭВОЛЮЦИЯ ПЛАЗМИД

Конъюгативный перенос обеспечивает поддержание плазмид в популяции клеток, а также возможность сочетания плазмид с разными хромосомами. Это важно как для самих плазмид, так и для бактерий, в которых они поддерживаются. В этом отношении наиболее значимой может быть структура корового компонента Ti-плазмид. Как уже отмечалось, по меньшей мере один из компонентов *tra*-регулона тесно связан с ориджином репликации классических Ti-плазмид группы IncRhI, а также некоторых *sym*-плазмид. Во всех случаях *trb*-оперон, включая ген *traI*, ориентирован противоположно *rep*-генам, и между ними находится сегмент размером 400-800 п.н. (рис. 2). На плазмиде pNGR234a второй компонент *tra*-регулона (*tra/oriT*) также тесно сцеплен с *rep*, тогда как на Ti-плазмидах он находится на значительном удалении. Эта организация не является уникальной для pNGR234a, так как выявлено высокое сходство локусов *trb/rep* Ti- и некоторых *sym*-плазмид *R. leguminosarum* (Prakash, Schilperoort, 1982). *Sym*-плазмиды гибридизуются с пробам на локус *tra/oriT* Ti-плазмид. Важно, что все три гена *rep*-локуса консервативны для Ti-плазмид и pNGR234a (Freiberg et al., 1997). Это позволяет считать, что локусы *rep/oriV* данных плазмид принадлежат к одному суперсемейству систем репликации крупных плазмид *Rhizobiaceae*.

В этой связи интересна работа по PCR-анализу генов *repC*, присутствующих на различных “симбиотических” и “несимбиотических” плазмидах (Turner et al., 1995). Полученные данные показали значительное разнообразие аллелей *repC*, причем для одной из плазмид (pRL8JI) выявлено сходство со структурным геном, белка TrbB, кодируемого Ti-плазмидой (результаты проведен-

ного нами анализа находятся в базе данных за номером X89447; Turner, Young, 1995). Как и в случае Ti-плазмид, этот ген ориентирован противоположно локусу *rep*. Однако, на pRL8JI отсутствует гомолог гена *traI*, присутствующий на Ti-плазмидах. Таким образом, выявлено разнообразие исходного базового репликона плазмид, причем разные их классы различаются природой генов, связанных с базовым репликоном.

Таким образом, Ti-плазмиды содержат *vir*-, T- и опин-катаболизирующие локусы, тогда как *sym*-плазмиды содержат гены образования клубеньков и азотфиксации. Однако крупные размеры этих плазмид говорят о присутствии большого числа генов, функции которых пока неясны. Возможно, что некоторые из этих функций могут быть сходными для плазмид ризобий и агробактерий. Действительно, у штамма L5-30 *S. meliloti* на *sym*-плазмиде выявлена система метаболизма сцилло-инозамина, которая по стратегии своей работы сходна с системой метаболизма опинов, кодируемой Ti-плазмидами (Murphy et al., 1987, 1988, 1993; глава 9).

Интересен вопрос о том, почему *tra*-регулон связан с этим консервативным репликоном. Данные о составе, организации и локализации генов показывают, что *tra*-регулон является основной частью плазмид. Элегантная работа с Ti-плазмидами *A. vitis* показала, что их эволюция связана с рекомбинациями крупных блоков ДНК (Otten et al., 1992). Поэтому разнообразие этих плазмид возникает главным образом не за счет мутаций, а за счет перераспределения имеющихся наборов генов. Результаты секвенирования pNGR234a, а также анализа различных участков других плазмид *Rhizobium*, показали, что механизмы эволюции "симбиотических" и "несимбиотических" плазмид в целом сходны. Основным источником новых фенотипов является перенос генов, который в значительной степени и обеспечивается за счет конъюгативных плазмид.

В этой связи логично предположить, что Ti (*sym*) плазмиды реципиентов могут рекомбинировать с плазмидами доноров. Показана возможность образования коинтеграторов между разными типами Ti-плазмид при их переносе у агробактерий (Ноукаас et al., 1980). Продукты такой рекомбинации могут оказаться более адаптированными к определенным условиям среды, чем исходные плазмиды. Если эта гипотеза верна, то можно предположить существование рекомбинантов между Ti-плазмидами напалин-агроцинопинового и октопин-маннитилового типов. Фактически описаны Ti-плазмиды *A. vitis* напалинового и октопин-кукумопинового типов, которые содержат крупные сегменты, гомологичные pTiC58 (Otten, De Ruffray, 1994), что служит хорошим подтверждением предложенного эволюционного сценария. Подобные рекомбинантные плазмиды известны и для *Rhizobium*. Так, при скрещивании различных биотипов *R. leguminosarum* (*viceae* и *trifolii*) был получен дериват *sym*-плазмиды первого типа, содержащий *nif*- и *nod*-гены *sym*-плазмиды второго типа (Djordjevic et al., 1983). Этот дериват, обозначенный pBR1AN, обеспечивал формирование симбиоза как с клевером, так и с горохом.

В то же время, плазмиды катаболизма опинов агробактерий, а также "несимбиотические" плазмиды ризобий, могут вступать в рекомбинацию, давая новые Ti- или *sym*-плазмиды. Возможно, что *sym*-плазмиды могут приобретать части Ti-плазмид, что подтверждается присутствием на *sym*-плазмиде (мегаплазмиде) штамма A3 *S. meliloti* сегмента, гомологичного *nod*-оперону Ti-плазмид напалин-агроцинопинового типа. Более того, данный штамм *S. meliloti* может использовать напалин как единственный источник углерода (Au, Dion, 1994).

VII.C. ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА

Данные об участии систем конъюгативного переноса плазмид в эволюции хромосом *Rhizobiaceae* носят предварительный характер. Имеются многочисленные доказательства высокой пластичности генома *Rhizobium*. Геномы *Rhizobium* и *Agrobacterium* содержат много повторяющихся последовательностей ДНК и IS-элементов, многие из которых могут перемещаться на плазмиды. Можно предположить, что собственные плазмиды являются векторами для переноса хромосомных генов у этих бактерий. Об этом говорят и данные о возможности мобилизации некоторых маркеров посредством Ti-плазмид (Dessaix et al., 1989; Cho et al., 1997). Однако данные о переносе хромосомных генов у этих бактерий практически отсутствуют.

В целом представляется доказанным, что консервативная организация локусов *tra* и *rep* отражает важность переноса плазмид Rhizobiaceae для их стабильного сохранения в популяциях и поддержания разнообразия бактерий. Возможно, что эта консервативность создает возможности и для широкого переноса хромосомных генов, что также повышает биоразнообразие бактерий.

VIII. Благодарности

Работа поддержана грантами R01 GM 52465 от NIH, AG93-37301-8943 и AG95-37312-1639 от USDA. Выражаю признательность Pei-Li Li, Audra Smyth, Ramon Penalver, Philippe Oger, Ingyu Hwang, Zhaoquin Luo, Kevin Piper, Stephen Winans, Clay Fuqua, Andrew Binns, Erich Lanka, Ananth Das, Walt Ream за плодотворное обсуждение рукописи.

IX. Литература

- Allardet-Servent A., Michaux-Charachon S., Jumas-Bilak E., Karayan L., Ramuz M. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 7869-7874.
- Alt-Morbe J., Stryker J.L., Fuqua C., Li P.-L., Farrand S.K., Winans S.C. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 4248-4257.
- Au S., Bergeron J., Dion P. (1994) *Abstr. 7-th Internat. Symp. Mol. Plant-Microbe Interact. Abstr. V. 1*, p. 15.
- Baldwin T.O., Devine J.H., Heckel R.C., Lin J.-W., Shadel G.S. (1989) *J. Biol. Chem.* V. 4, p. 326-341.
- Beck von Bodman S., Hayman G.T., Farrand S.K. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 89, p. 643-647.
- Beck von Bodman S., McCutchan J.E., Farrand S.K. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 5281-5289.
- Beijersbergen A., den Dulk-Ras A., Schilperoort R.A., Hooykaas P.J.J. (1992) *Science*. V. 256, p. 1324-1327.
- Blattner F.R., Plunkett I.G., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y. (1997) *Science*. V. 277, p. 1453-1462.
- Brewin N.J., Beringer J.E., Johnston A.W.B. (1980) *J. Gen. Microbiol.* V. 120, p. 413-420.
- Buchanan-Wollaston V., Passiatore J.E., Cannon F. (1987) *Nature*. V. 328, p. 172-175.
- Cho K., Fuqua C., Winans S.C. (1997) *J. Bacteriol.* V. 179, p. 1-8.
- Cho K., Winans S.C. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 7715-7719.
- Clare B.C., Kerr A., Jones D.A. (1990) *Plasmid*. V. 23, p. 126-137.
- Climo M.W., Sharma V.K., Archer G.L. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 4975-4983.
- Cook D.M. (1996) Ph.D. thesis. University of Illinois, Urbana, Illinois, USA.
- Cook D.M., Farrand S.K. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 6238-6246.
- Cook D.M., Li P.-L., Ruchaud F., Padden S., Farrand S.K. (1997) *J. Bacteriol.* V. 179, p. 1291-1297.
- De Greve H., Decraemer H., Seurinck J., van Montagu M., Schell J. (1981) *Plasmid*. V. 6, p. 235-248.
- Dessaux Y., Petit A., Ellis J.G., Legrain C., Demarez M., Wiame J.-M., Popoff M., Tempe J. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 6363-6366.
- Djordjevic M.A., Zurkowski W., Shine J., Rolfe B.G. (1983) *J. Bacteriol.* V. 156, p. 1035-1045.
- Drummond M.H., Chilton M.-D. (1978) *J. Bacteriol.* V. 136, p. 1178-1183.
- Dunlap P.V., Greenberg E.P. (1991) In: Dworkin M. (ed.), *Microb. Cell-Cell Interact.*, p. 219-253. American Society for Microbiology, Washington DC.
- Eberhard A., Burlingame A.L., Eberhard C., Kenyon G.L., Nealson K.H., Oppenheimer N.J. (1981) *Biochemistry*. V. 20, p. 2444-2449.
- Eberhard A., Longin T., Widrig C.A., Stranick S.J. (1991) *Arch. Microbiol.* V. 155, p. 294-297.
- Ellis J.G., Murphy P.J., Kerr A. (1982a) *Mol. Gen. Genet.* V. 186, p. 275-281.
- Ellis J.G., Kerr A., Petit A., Tempe J. (1982b) *Mol. Gen. Genet.* V. 186, p. 269-274.
- Engler G., Depicker A., Maenhaut R., Villarreal R., van Montagu M., Schell J. (1981) *J. Mol. Biol.* V. 152, p. 183-208.
- Farrand S.K. (1991) In: Pimentel D. (ed.), *CRC Handb. Pest Manag. Agric.*, 2nd ed., V. 11, p. 311-329, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Farrand S.K. (1993) In: Clewell D.B. (ed.), *Bacter. Conjug.*, p. 255-291, Plenum Press, NY.
- Farrand S.K., Hwang I., Cook D.M. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 4233-4247.
- Farrand S.K., Slota J.E., Shim J.-S., Kerr A. (1985) *Plasmid*. V. 13, p. 106-117.
- Farrand S.K., Wang C.-L., Hong S.-B., O'Morchoe S.B., Slota J.E. (1992) *Plasmid*. V. 28, p. 201-212.
- Freiberg C., Fellay R., Bairoch A., Broughton W.J., Rosenthal A., Perret X. (1997) *Nature*. V. 387, p. 394-401.
- Fullner K.J., Nester E.W. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 1498-1504.
- Fuqua C., Burbee M., Winans S.C. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 1367-1373.
- Fuqua C., Winans S.C. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 2796-2806.
- Fuqua C., Winans S.C. (1996a) *Mol. Microbiol.* V. 20, p. 1199-1210.
- Fuqua C., Winans S.C. (1996b) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 435-440.
- Fuqua C., Winans S.C., Greenberg E.P. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 269-275.

- Fuqua C., Winans S.C., Greenberg E.P. (1996) *Annu. Rev. Microbiol.* V. 50, p. 727-751.
- Gelvin S.B., Habeck L.L. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 1600-1608.
- Genetello C., van Larebeke N., Holsters M., De Picker A., van Montagu M., Schell J. (1977) *Nature.* V. 265, p. 561-563.
- Grahn A.M., Haase J., Lanka E., Bamford D.H. (1997) *J. Bacteriol.* V. 179, p. 4733-4740.
- Haase J., Kalkum M., Lanka E. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 6720-6729.
- Haase J., Lanka E. (1997) *J. Bacteriol.* V. 179, p. 5728-5735.
- Haase J., Lurz R., Grahn A.M., Bamford D.H., Lanka E. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 4779-4791.
- Habeeb L., Wang L., Winans S.C. (1991) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 4, p. 379-385.
- Hamilton C.M., Cook D.M., Lanka E., Farrand S.K. (1996) *Abstr. 96-th Gen. Mtg. Amer. Soc. Microbiol. Abstr.* H77, p. 496.
- Hayman G.T., Beck von Bodman S., Kim H., Jiang P., Farrand S.K. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 5575-5584.
- Hayman G.T., Farrand S.K. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 1759-1767.
- Holsters M., Silva B., van Vliet F., Genetello C., de Block M., Dhaese P., Depicker A., Inze D., Engler G., Villarreal R., van Montagu M., Schell J. (1980) *Plasmid.* V. 2, p. 212-230.
- Hooykaas P.J.J., Den Dulk-Ras H., Ooms G., Schilperoort R.A. (1980) *J. Bacteriol.* V. 143, p. 1295-1306.
- Hooykaas P.J.J., Den Dulk-Ras H., Regensburg-Tuinik A.J.G., Van Brussel A.A.N., Schilperoort R.A. (1985) *Plasmid.* V. 14, p. 47-52.
- Hooykaas P.J.J., Klapwijk P.M., Nuti M.P., Schilperoort R.A., Rorsch A. (1977) *J. Gen. Microbiol.* V. 98, p. 477-484.
- Hooykaas P.J.J., Roobol C., Schilperoort R.A. (1979) *J. Gen. Microbiol.* V. 110, p. 99-109.
- Hooykaas P.J.J., Snijdwint F.G.M., Schilperoort R.A. (1982) *Plasmid.* V. 8, p. 73-82.
- Hooykaas P.J.J., van Brussel A.A.N., den Dulk-Ras H., van Slogteren G.M.S., Schilperoort R.A. (1981) *Nature.* V. 291, p. 351-353.
- Huisman G.W., Kotter R. (1994) *Science.* V. 265, p. 537-539.
- Hwang I., Cook D.M., Farrand S.K. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 449-458.
- Hwang I., Li P.-L., Zhang L., Piper K.R., Cook D.M., Tate M.E., Farrand S.K. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 91, p. 4639-4643.
- Johnston A.W.B., Beynon J.L., Buchanan-Wollaston A.V., Satchell S.M., Hirsch P.R., Beringer J.E. (1978) *Nature.* V. 276, p. 634-636.
- Johnston A.W.B., Hombrecher G., Brewin N.J., Cooper M.C. (1982) *J. Gen. Microbiol.* V. 128, p. 85-93.
- Jones D.A., Ryder M.H., Clare B.G., Farrand S.K., Kerr A. (1988) *Mol. Gen. Genet.* V. 212, p. 207-214.
- Jouanin L. (1984) *Plasmid.* V. 12, p. 91-102.
- Kaplan H.B., Greenberg E.P. (1985) *J. Bacteriol.* V. 163, p. 1210-1214.
- Kerr A. (1969) *Nature.* V. 223, p. 1175-1176.
- Kerr A. (1971) *Physiol. Plant Pathol.* V. 1, p. 241-246.
- Kerr A., Manigault P., Tempe J. (1977) *Nature.* V. 265, p. 560-561.
- Kim H., Farrand S.K. (1997) *J. Bacteriol.* V. 179, p. 7559-7572.
- Kim H., Farrand S.K. (1998) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 11, p. 131-143.
- Kim K.S., Farrand S.K. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 3275-3284.
- Kinkle B.K., Schmidt E.L. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 57, p. 3264-3269.
- Klapwijk P.M., Schilperoort R.A. (1979) *J. Bacteriol.* V. 139, p. 424-431.
- Klapwijk P.M., Scheulderman T., Schilperoort R.A. (1978) *J. Bacteriol.* V. 136, p. 775-785.
- Knauf V.C., Nester E.W. (1982) *Plasmid.* V. 8, p. 45-54.
- Komari T., Halperin W., Nester E.W. (1986) *J. Bacteriol.* V. 166, p. 88-94.
- Kondorosi A., Kondorosi E., Pankhurst C.E., Broughton W.J., Banfalvi Z. (1982) *Mol. Gen. Genet.* V. 188, p. 433-439.
- Kovacs L.G., Pueppke S.G. (1994) *Mol. Gen. Genet.* V. 242, p. 327-336.
- Lamb J.W., Hombrecher G., Johnston A.W.B. (1982) *Mol. Gen. Genet.* V. 186, p. 449-452.
- Lessl M., Pansegrau W., Lanka E. (1992) *Nucleic Acids Res.* V. 20, p. 6099-6100.
- Lessl M., Balzer D., Weyrauch K., Lanka E. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 6415-6425.
- Melchers L.S., Maroney M.J., den Dulk-Ras A., Thompson D.V., van Vuuren H.A.J., Schilperoort R.A., Hooykaas P.J.J. (1990) *Plant Mol. Biol.* V. 14, p. 249-259.
- Mercado-Blanco J., Olivares J. (1993) *Arch. Microbiol.* V. 160, p. 477-485.
- Mercado-Blanco J., Toro N. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 535-545.
- Moore L.W., Warren G., Strobel G. (1979) *Plasmid.* V. 2, p. 617-626.
- More M., Finger L.D., Stryker J.L., Fuqua C., Eberhard A., Winans S.C. (1996) *Science.* V. 272, p. 1655-1658.
- Murphy P.J., Heycke N., Banfalvi Z., Tate M.E., de Bruijn F., Kondorosi A., Tempe J., Schell J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 84, p. 493-497.
- Murphy P.J., Heycke N., Trenz S.P., Ratet P., de Bruijn F., Kondorosi A., Tempe J., Schell J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 85, p. 9133-9137.
- Murphy P.J., Trenz S.P., Grzemski W., de Bruijn F.J., Schell J. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 5193-5204.
- Oger P., Kim K.S., Sackett R.L., Piper K.R., Farrand S.K. (1998) *Mol. Microbiol.* V. 27, p. 277-288.
- Okamoto S., Toyoda-Yamamoto A., Ito K., Takebe I., Machida Y. (1991) *Mol. Gen. Genet.* V. 228, p. 24-32.
- Otten L., Canaday J., Gerard J.-C., Fournier P., Crouzet P., Paulus F. (1992) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 5, p. 279-287.
- Otten L., De Ruffray P. (1994) *Mol. Gen. Genet.* V. 245, p. 493-505.

- Otten L., Gerard J.-C., De Ruffray P. (1993) *Plasmid*. V. 29, p. 154-159.
- Pansegrau W., Balzer D., Kruff V., Lurz R., Lanka E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 87, p. 6555-6559.
- Pansegrau W., Lanka E. (1991) *Nucleic Acids Res.* V. 19, p. 345.
- Pansegrau W., Lanka E., Barth P.T., Figurski D.H., Guiney D.G., Haas D., Helinski D.R., Schwab H., Stanisch V.A., Thomas C.M. (1994) *J. Mol. Biol.* V. 239, p. 623-663.
- Petit A., David C., Dahl G.A., Ellis J.G., Guyon P., Casse-Delbart E., Tempe J. (1983) *Mol. Gen. Genet.* V. 190, p. 204-214.
- Petit A., Tempe J. (1978) *Mol. Gen. Genet.* V. 167, p. 147-155.
- Piper K.R., Beck von Bodman S., Farrand S.K. (1993) *Nature*. V. 362, p. 448-450.
- Pohlman R.F., Genetti H.D., Winans S.C. (1994) *Mol. Microbiol.* V. 14, p. 655-668.
- Prakash R.K., Schilperoord R.A. (1982) *J. Bacteriol.* V. 149, p. 1129-1134.
- Pretorius-Guth I.-M., Puhler A., Simon R. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 56, p. 2354-2359.
- Ramirez-Romero M.A., Bustos P., Girard O.R., Cevallos M.A., Davila G. (1997) *Microbiology*. V. 143, p. 2825-2831.
- Rao J.R., Fenton M., Jarvis B.D.W. (1994) *Soil Biol. Biochem.* V. 26, p. 339-351.
- Rogovsky P.M., Powell B.S., Shirasu K., Lin T.-S., Morel P., Zyprian E.M., Steck T.R., Kado C.I. (1990) *Plasmid*. V. 23, p. 85-106.
- Rosemeyer V., Michiels J., Verreth C., Vanderleyden J. (1998) *J. Bacteriol.* V. 180, p. 815-821.
- Sawada H., Ieki H., Oyaizu H., Matsumoto S. (1993) *Intern. J. Syst. Bacteriol.* V. 43, p. 694-702.
- Schaefer A.L., Hanzelka B.L., Cronan Jr. J.E., Greenberg E.P. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 93, p. 9505-9509.
- Scherzinger E., Lurz R., Otto S., Dobrinski B. (1992) *Nucl. Acids Res.* V. 20, p. 41-48.
- Schofield P.R., Gibson A.H., Dudman W.F., Watson J.M. (1987) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 53, p. 2942-2947.
- Scholz P., Haring V., Wittmann-Liebold B., Ashman K., Bagdasarian M., Scherzinger E. (1989) *Gene*. V. 75, p. 271-288.
- Sciaky D., Montoya A.L., Chilton M.-D. (1977) *Plasmid*. V. 1, p. 238-253.
- Silverman P.M. (1997) *Mol. Microbiol.* V. 23, p. 423-429.
- Sprinzl M., Geider K. (1988) *J. Gen. Microbiol.* V. 134, p. 413-424.
- Steck T.R., Kado C.I. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 2191-2193.
- Stevens A.M., Dolan K.M., Greenberg E.P. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 91, p. 12619-12623.
- Stevens A.M., Greenberg E.P. (1997) *J. Bacteriol.* V. 179, p. 557-562.
- Stockwell V.O., Moore L.W., Loper J.E. (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 59, p. 2112-2120.
- Swift S., Throup J.P., Williams P., Salmond G.P.C., Stewart G.S.A.B. (1996) *Trends Biol. Sci.* V. 21, p. 214-219.
- Szgedi E., Otten L., Czako M. (1992) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 5, p. 435-438.
- Tempe J., Petit A., Holsters M., van Montagu M., Schell J. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 74, p. 2848-2849.
- Turner S.L., Rigottier-Gois L., Power R.S., Amarger N., Young J.P.W. (1996) *Microbiology*. V. 142, p. 1705-1713.
- Turner S.L., Young J.P.W. (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 133, p. 53-58.
- Unger L., Ziegler S.F., Huffman G.A., Knauf V.C., Peet R., Moore L.W., Gordon M.P., Nester E.W. (1985) *J. Bacteriol.* V. 164, p. 723-730.
- Valdivia R.H., Wang L., Winans S.C. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 6398-6405.
- Van Montagu M., Schell J. (1979) In: Timmis K.N., Puhler A. (eds). *Plasmids of Medical, Environ. Commer. Import.*, p. 71-95, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Vaudequin-Dransart V., Petit A., Poncet C., Ponsonnet C., Nesme X., Jones J.B., Bouzar H., Chilton W.S., Dessaux Y. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 311-321.
- Vicedo B., Penalver R., Asins M., Lopez M.M. (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 59, p. 309-315.
- Von Lintig J., Zanker H., Schroder J. (1991) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 4, p. 370-378.
- Wang L., Helmann J.D., Winans S.C. (1992) *Cell*. V. 69, p. 659-667.
- Waters V.L., Stack B., Pansegrau W., Lanka E., Guiney D.G. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 6666-6673.
- Watson B., Currier T.C., Gordon M.P., Chilton M.-D., Nester E.W. (1975) *J. Bacteriol.* V. 123, p. 255-264.
- White F.F., Nester E.W. (1980) *J. Bacteriol.* V. 144, p. 710-720.
- Willems A., Collins M.D. (1993) *Intern. J. Syst. Bacteriol.* V. 43, p. 305-313.
- Zanker H., Lurz G., Langridge U., Langridge P., Kreusch D., Schroder J. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 4511-4517.
- Zanker H., Von Lintig J., Schroder J. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 841-849.
- Zhang L., Kerr A. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 1867-1872.
- Zhang L., Murphy P.J., Kerr A., Tate M.E. (1993) *Nature*. V. 362, p. 446-448.
- Zhu J., Winans S.C. (1998) *Mol. Microbiol.* V. 27, p. 289-297.

Прикрепление Rhizobiaceae к растительным клеткам

Маттис Э. Кайн Я.

I.	Введение.....	259
	I.A. Взаимодействие <i>Agrobacterium</i> -растение.....	259
	I.B. Взаимодействие <i>Rhizobium</i> -растение.....	260
	I.C. Сопоставление агробактерий и ризобий.....	261
II.	Методы.....	261
	II.A. Агробактерии.....	261
	II.B. Ризобии.....	262
III.	Генетика адгезии бактерий.....	263
	III.A. Агробактерии.....	263
	III.B. Ризобии.....	265
IV.	Адгезины бактерий.....	266
	IV.A. Агробактерии.....	266
	IV.B. Ризобии.....	267
V.	Адгезины растений.....	268
VI.	Факторы среды.....	271
VII.	Заключение.....	272
VIII.	Литература	272

I. Введение

Rhizobiaceae – семейство почвенных бактерий, которые могут, благодаря наличию специальных генных систем, на значительное время “уходить” из неблагоприятных условий почвы в ткани растений. При этом они значительную часть времени находятся в состоянии прикрепления к поверхности растительных клеток. Вариабильная структура клеточных стенок растений обеспечивает возможность различных физико-химических контактов, начиная от образования гидрофобных связей и кончая взаимодействиями “лиганд-рецептор”. Прикрепление к растительным клеточным стенкам подробно изучено у *Agrobacterium* и (*Sino/Meso/Brady/Azo*) *Rhizobium* (последние обычно называют ризобиями), которые и будут обсуждаться в данной главе.

Корни растений привлекают агробактерий и ризобий. Бактерии проявляют хемотаксис на основные компоненты корневых экссудатов – сахара и аминокислоты (Gaworzewska, Carlile, 1982; Hawes, Smith, 1989). Благодаря хемотаксису бактерии колонизируют корни растений и формируют на них микроколонии, биопленки или прилипают к раневым поверхностям. Последние могут возникать благодаря действию внешних факторов (включая опыты, проводимые учеными) или быть результатом повреждения тканей в ходе нормальных ростовых процессов (например, разрывы эпидермиса в местах появления боковых корней).

I.A. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ *AGROBACTERIUM*-РАСТЕНИЕ

После проникновения в рану *A. tumefaciens* связывается с поверхностью растительных клеток (Matthysse, 1986), затем благодаря синтезу бактериями целлюлозных фибрилл это связывание становится необратимым (Matthysse, 1983). Под действием фенольных веществ (ацетосирингон и род-

ственные соединения), в условиях низкого pH и в присутствии сахаров, обычно выделяемых в ранах растений, происходит индукция бактериальных *vir*-генов, которые находятся на специальной плазмиде, обозначенной pTi (Binns, Thomashow, 1988). Эти гены определяют формирование пилей, кодируемое опероном *virB* (Sanders et al., 1991; Pohlman et al., 1994; Lessi, Lanka, 1994; Kado, 1994; Fullner et al., 1996) и перенос Т-ДНК из бактерий в растение, опосредованный продуктами генов *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, а возможно и другими белками (Klee et al., 1983). Затем Т-ДНК встраивается в растительную хромосому (Chilton et al., 1977). Экспрессия Т-ДНК в растительных клетках вызывает синтез ауксинов и цитокининов, что приводит к неконтролируемому размножению клеток и формированию опухоли — корончатого галла (Akiyoshi et al., 1982; Binns, Thomashow, 1988). Среди других генов, входящих в состав Т-ДНК, наиболее изучены гены биосинтеза опинов (Tempe et al., 1984). На Ti-плазмиде (но не в Т-ДНК) находятся гены, обуславливающие способность бактерий использовать опины как единственный источник азота и углерода. Поэтому индукция биосинтеза опинов в опухоли дает бактериям дополнительный источник питания, что и является стимулом для колонизации растения (глава 12).

Первичное прикрепление агробактерий к растительным клеткам, обсуждаемое в этой главе, является прелюдией к вторичному прикреплению (возможно, обусловленному пилиями) и для переноса Т-ДНК. Агробактерии передают Т-ДНК в широкий круг двудольных растений, а также в некоторые однодольные и голосемянные. Во всех случаях этот процесс начинается с прикрепления бактерий к растительным клеткам (Matthysse, 1986). Кроме того, первичное прикрепление может обеспечивать колонизацию агробактериями интактных корней. Остается неясным, насколько этот процесс сходен с прикреплением агробактерий к растительным клеткам в зоне поранения. Одна из групп агробактерий (*A. vitis* — патоген винограда) проникает в корни и заселяет ксилему (Burt et al., 1995), однако механизм ее колонизации неясен (глава 10).

I.V. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ *RHIZOBIUM*-РАСТЕНИЕ

Ризобии также способны колонизировать корни и раны растений, однако это лишь начальный этап взаимодействия. Ризобии могут проникать в интактные растительные клетки, а именно в растущие корневые волоски и клетки кортекса. Некоторые ризобии проникают в корень через разрывы эпидермиса или между эпидермальными клетками. Взаимодействие партнеров является весьма специфичным: оно включает бобовые растения (сем. Fabaceae) и род *Parasponia* (сем. Ulmaceae). При воздействии флавоноидных веществ, выделяемых корнями и семенами растений, ризобии продуцируют особые сигнальные липо-хито-олигосахаридные (LCO) молекулы (Leroche et al., 1990; Spaink et al., 1991). Это свойство кодируется *nod*-генами, которые находятся на специальной плазмиде (pSym) или в хромосоме. LCO необходимы для инфицирования: они активируют растительные клетки. При этом клетки эпидермиса и наружного кортекса или "разрешают" межклеточное проникновение, или формируют трубчатую апикально растущую структуру — инфекционную нить, посредством которой бактерии проникают через корневой волосок и кортекс (van Brussel et al., 1992). Образование инфекционных нитей возможно лишь при наличии живых бактерий. Помимо LCO, в этом процессе участвуют поверхностные полисахариды ризобий (Leigh, Walker, 1994). Считается, что формирование инфекционной нити начинается в сайте прикрепления бактерий к кончику корневого волоска и инициируется локальным выделением LCO. В процессе прикрепления бактерии переходят от непрочного обратимого связывания к более прочному связыванию, обусловленному образованием особых фибрилл (Smith et al., 1987). Однако, последующее размножение в местах сгиба корневых волосков, внутри инфекционных нитей или в межклеточных пространствах кортекса не требует прикрепления бактерий к поверхности растительных клеток. Таким образом, для агробактерий основное взаимодействие с растительной клеткой (передача Т-ДНК) происходит в состоянии прикрепления, тогда как для ризобий это состояние представляет собой лишь промежуточный этап симбиоза (см. главу 22).

Инфицирование корней ризобиями завершается формированием клубеньков. Бактерии поглощаются клетками клубенька и дифференцируются в азотфиксирующие бактериоиды (глава 23). Однако это происходит лишь с частью бактерий, а большинство из них остается в клубеньке в

недифференцированном состоянии и после отмирания клубенька переходит в почву. Таким образом, клубенек может рассматриваться как “накопительная культура” бактерий. Ризобии, как и агробактерии, могут колонизировать поверхности растительных корней, что является предметом особых исследований.

1.С. СОПОСТАВЛЕНИЕ АГРОБАКТЕРИЙ И РИЗОБИЙ

В норме ризобии не конъюгируют с растительными клетками, однако перенос Ti-плазмид в некоторые штаммы ризобий придает им способность формировать у растений опухоли (Hooykaas et al., 1977). Это показывает, что механизм прикрепления ризобий и агробактерий к растительным клеткам в раневых поверхностях является сходным. Обычно рекомбинантные ризобии индуцируют более мелкие опухоли, чем агробактерии, что говорит о сниженной эффективности конъюгации с растительными клетками.

Клетки агробактерий могут прикрепляться к корням бобовых. Перенос в агробактерии *nod*-генов придает им способность к синтезу LCO и образованию клубеньков (Hooykaas et al., 1981). Однако формирование такими рекомбинантами инфекционных нитей происходит с нарушениями, что говорит о необходимости дополнительных генов, имеющих только у ризобий.

Ризобии и агробактерии имеют сходный двухступенчатый механизм прикрепления к растительным клеткам (Dazzo, Truchet, 1983; Smit et al., 1992), тогда как следующие за ним процессы — конъюгация (у агробактерий) и формирование инфекционных нитей (у ризобий) определяются специфическими генами, которые могут влиять и на прикрепление. Так, ризобии в ризосфере активно продуцируют молекулы LCO, влияющие на рост корневых волосков, к которым происходит прикрепление (Heidstra et al., 1994; глава 22). При этом, по-видимому, происходит и изменение поверхностных свойств кончиков корневых волосков, то есть выделение LCO меняет свойства поверхности, к которой прикрепляются ризобии, что, в свою очередь, меняет характер выделения LCO и рост корневых волосков.

Важно отметить, что агробактерии обладают широким спектром растений-хозяев, включающим табак, морковь, *Arabidopsis thaliana*, тогда как у ризобий спектр хозяев узок (для каждого вида он обычно ограничен небольшой группой бобовых). Это показывает, что уже наиболее ранние стадии взаимодействия с растениями у этих бактерий могут существенно различаться (Matthysse, 1996). Более того, агробактерии могут индуцировать опухоли на различных растительных органах, включая корни, корнеплоды и клубни, стебли и листья, тогда как подавляющее большинство ризобий инфицирует лишь корни. Вторая стадия прикрепления, включающая формирование целлюлозных фибрилл, происходит у ризобий и агробактерий сходным образом.

В предлагаемой статье мы попытаемся ответить на вопрос о том, в какой степени выявленные сходства и различия симбиотических свойств ризобий и агробактерий могут быть объяснены на основании данных об их прикреплении к растительным клеткам. Обсуждение этого вопроса мы начнем с методов, используемых при изучении прикрепления ризобий и агробактерий к клеткам растений.

II. Методы

Методы анализа прикрепления бактерий к растительным клеткам должны удовлетворять двум условиям: (1) обеспечивать условия, максимально приближенные к естественным, (2) давать возможность прямой количественной оценки прикрепления. Часто эти условия оказываются трудно совместимыми, что затрудняет интерпретацию получаемых результатов.

II.A. АГРОБАКТЕРИИ

В ранних работах практиковалась непрямая оценка прикрепления *A. tumefaciens* к растительным клеткам, основанная на ингибировании формирования опухолей на листьях фасоли различными веществами или бактериальными штаммами, влияющими на адгезию (Lippincott, Lippincott,

1969). Недостатком этого подхода было то, что любое воздействие, влияющее на формирование опухолей, оценивалось как действие на прикрепление бактерий к растительным клеткам. Однако неясно, может ли ингибирование образования опухолей, наблюдаемое при действии бактериальных липополисахаридов или метилированного пектина растений, рассматриваться именно как результат нарушения прикрепления.

В конце 70-х годов были предложены прямые методы оценки прикрепления агробактерий к поверхности культивируемых растительных клеток (Matthysse et al., 1978; Ohyama et al., 1979). В этих работах прикрепление оценивали микроскопически, с использованием радиоактивной метки, либо путем определения числа жизнеспособных бактерий. Основным недостатком этих методик было то, что растительные клетки в культуре могли значительно отличаться от клеток в раневой поверхности, дающих начало опухоли.

Микроскопический анализ требует использования большого числа бактерий, а количественная оценка его результатов затруднена, хотя он позволяет определить пространственную локализацию бактерий. Опыты с радиоактивными метками также требуют наличия большого числа бактерий, но их результаты поддаются достаточно точной количественной оценке с учетом поправки на снижение интенсивности излучения. Однако, в этих опытах бактерии, оказавшиеся в ткани, но не прикрепленные к растительным клеткам, могут быть учтены как прикрепленные. Это относится и к бактериям, которые прикрепилась к поверхности других бактерий, а не к растительной клетке. Подсчет жизнеспособных бактерий, находящихся в свободном и прикрепленном состоянии, имеет то преимущество, что требует относительно небольшого числа клеток. Подсчет свободных бактерий может считаться достаточно точным, тогда как в случае прикрепленных бактерий мы обычно не можем быть полностью уверенными, что все они отделились от растительных клеток. В этом случае, как и при других количественных оценках, все бактерии, как проникшие в ткань, так и прикрепленные к растительным клеткам, считаются прикрепленными. Более того, во всех анализах, не связанных с микроскопированием, необходима отмывка и сбор растительной ткани. Использование методов смыва часто приводит к потере недостаточно прочно связанных бактерий, тогда как методы отделения свободных бактерий, присутствующих в ткани, от прикрепленных бактерий приводят к фракционированию больших агрегатов бактерий и растительных клеток. Эти агрегаты, если они прикреплены к растительным клеткам, будут подсчитаны как связанные бактерии (Matthysse, 1995).

Анализ прикрепления *A. tumefaciens* часто производится с использованием тканевых срезов, что дает преимущество в том случае, если на срезах могут формироваться опухоли. Дополнительные трудности возникают в том случае, если ткань имеет неровную поверхность, что резко повышает число проникших в нее бактерий, тогда как микроскопирование таких поверхностей затруднено. Прикрепление бактерий к клеткам корневого чехлика или к поверхности корней может быть изучено путем световой микроскопии (Hawes, Brigman, 1992). Однако эти клетки во многом отличаются от клеток в раневых поверхностях, и полученные результаты могут не отражать процессы, происходящие при нормальном патогенезе и образовании опухолей.

II. В. РИЗОБИИ

Изучение прикрепления ризобий имеет то преимущество, что его можно проводить на поверхности корней, где в норме индуцируется симбиотическое взаимодействие. Корневые волоски, в которых начинается развитие симбиоза, обычно могут быть легко визуализированы, так что для определения интенсивности прикрепления, которое предшествует инфекции, многие авторы предпочитают использовать микроскоп. Методы, не связанные с микроскопированием (использование радиоактивных бактерий, подсчет числа жизнеспособных клеток), могут быть полезными при изучении колонизации корней в целом. Важно отметить, что большая часть клубеньков у многих бобовых формируется в зоне корня, которая в момент инокуляции еще не имела корневых волосков (Bhuvaneswari et al., 1981). Однако описано прикрепление ризобий в зоне корня, которая находится в состоянии, близком к началу формирования корневых волосков.

При использовании методов прямого подсчета очень важным является физиологическое состояние корневых волосков. Молодые волоски представляют собой выросты эпидермальных клеток, которые увеличиваются путем апикального роста, продолжение которого во время проведения опыта зависит от его условий. Этот рост может нарушаться на определенных средах или под действием сигнальных факторов ризобий. Весьма полезным, хотя и трудоемким методом является микроскопирование корневых волосков на проростках, инкубируемых между покровным и предметным стеклом в среде, что обеспечивает нормальный инфекционный процесс, а иногда и развитие клубеньков (Fahraeus, 1957; Dazzo et al., 1976).

Для анализа прикрепления клеток *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* использовали также культивируемые клетки сои, риса или спаржи (Ho et al., 1988; Terouchi, Syono, 1990). Преимущества и недостатки этого метода рассмотрены в предыдущем разделе.

Для получения достоверных результатов при использовании микроскопических методов требуется внесение большого числа бактерий – не менее 10^6 клеток на 1 мл (Smit et al., 1986). Однако, в природных условиях образование клубеньков может происходить при концентрации инокулюма 10^3 клеток/мл и даже менее. В связи с этим был предложен комбинированный метод, при котором инокуляцию производят небольшим числом бактерий, а число прикрепившихся бактерий определяют после отмывки проростков и их инкубирования на питательной среде, позволяющего через несколько дней подсчитать число микроколоний вдоль корня (Caetano-Anolles, Favelukes, 1986a). Недостатками этого метода является то, что: (1) производится подсчет бактерий, прикрепившихся к растительным клеткам, которые не подвергаются инфицированию, (2) не учитывается прикрепление неделящихся клеток, (3) разрыв во времени между моментами прикрепления и подсчета может вызывать действие факторов, влияющих на образование колоний, а не на прикрепление бактерий. В то же время, данный метод оказался полезным при изучении специфичности взаимодействия между ризобиями и корнями растений (Caetano-Anolles, Favelukes, 1986b).

III. Генетика адгезии бактерий

Применение генетических подходов, основанных на утрате или приобретении функции, оказалось удобным для выявления адгезинов. Для Rhizobiaceae опыты, связанные с приобретением функции, пока не проводились. В опытах, связанных с потерей функции, могут быть выявлены по меньшей мере 4 класса мутаций, нарушающих: (1) взаимодействия, происходящие до прикрепления бактерий к растительным клеткам, (2) структуру сайта прикрепления, (3) общую структуру поверхности бактерий, (4) образование на их поверхности материала, маскирующего сайт связывания (например, экзополисахаридов). Неспособные к прикреплению бактериальные мутанты всех 4 классов выявлены у *A. tumefaciens* биотипа 1. К настоящему времени описано несколько мутантов ризобий, относящихся к классам (2) и (3).

III.A. АГРОБАКТЕРИИ

Все выявленные гены агробактерий, контролирующие прикрепление к растительным клеткам, находятся в хромосоме. У полученных мутантов нарушены стадии взаимодействия, как предшествующие адгезии, так и нарушающие ее (Reuhs et al., 1997). Мутации *att* локализованы в районе хромосомы, имеющем размер 30 т.п.н. Некоторые из них (*attA1-attH*) могут быть комплементированы при добавлении среды, в которой до этого в течение нескольких часов совместно инкубировали клетки агробактерий и растений, после чего среду стерилизовали путем фильтрации (Matthysse, 1994; Matthysse et al., 1996). Ни один из партнеров в одиночку не может обеспечивать необходимое изменение состава среды. Последовательное инкубирование партнеров приводит к необходимой модификации среды только в том случае, когда растительные клетки добавляются раньше, чем агробактерии. Это показывает, что растительные клетки выделяют сигнал, в который необходим для появления у бактерий способности к прикреплению. Мутанты *attA1-attH* могут иметь дефекты по восприятию растительного сигнала или по способности отвечать на него. Инте-

ресно, что гены *attA1-attH* проявляют гомологию с генами, кодирующими АВС-транспортную систему. Мутанты *attJ* и *attR* не могут комплементироваться модифицированной средой и возможно, лишены сайта прикрепления (Matthysse et al., 1996; Reuhs et al., 1997). Важно, что они полностью лишены вирулентности.

Ген *attR* гомологичен транс-ацетилазам (Reuhs et al., 1997). При сравнении со штаммом дикого типа у мутанта было выявлено отсутствие капсульного полисахарида. Этот полисахарид ацетилирован и имеет низкую молекулярную массу (3–5 кДа), содержит глюкозу, глюкозамин и неидентифицированный сахар, сходный с 2-кето-3-деоксиктулозоновой кислотой (KDO) и, возможно, является К-антигеном (глава 7). Очищенные полисахариды штамма дикого типа ингибировали связывание агробактерий с клетками моркови и с корнями *A. thaliana* (рис. 1).

У трех мутантов агробактерий, неспособных связываться с растительными клетками, выявлены неспецифические изменения поверхности. Мутанты по генам *chvA* и *chvB* имеют нарушения синтеза β -1,2-глюкана, который находится в периплазматическом пространстве и участвует в адаптации бактерий к изменениям осмотического давления (Douglas et al., 1982; Puvanesarajah et al., 1985). Мутации в этих генах нарушают вирулентность на некоторых, но не на всех растениях-хозяевах. Они являются плеiotропными: помимо отсутствия глюкана мутанты имеют нарушенную подвижность и продуцируют повышенное количество кислых экзополисахаридов. Аналогичные мутанты ризобий возникают при нарушении генов *ndvA* и *ndvB*, участвующих в образовании клубеньков.

Действие мутации *chvB* на образование клубеньков было изучено после того, как в агробактерии перенесли гены ризобий, кодирующие синтез LCO. Полученные рекомбинанты оказались неспособными прикрепляться к корням гороха и инфицировать их (Swart et al., 1993).

Мутанты агробактерий по гену *pscA* (*exoC*) не способны синтезировать глюкозо-1-фосфат (Zorregueta et al., 1988). Они имеют резкие нарушения свойств поверхностных полисахаридов и плохо растут на агаровой среде Луриа (Cangelosi et al., 1987; Thomashow et al., 1987). Прикрепление этих мутантов к растительным клеткам изучали в опытах с клеточной культурой. Тот факт, что мутанты не вирулентны на большинстве растений, показал, что в этих опытах могут быть выявлены механизмы, существенные для клеточного взаимодействия. Однако бактерии могут иметь гены, которые невозможно выявить с использованием клеточной культуры. Кроме того, все эти мутанты, за исключением *pscA* (получен у штамма А6), являются производными штамма C58. Поэтому очевидно, что мы не имеем данных о штамм-специфических генах, контролирующих прикрепление к растительным клеткам.

Прикрепление *A. tumefaciens* и многих ризобий к растительным клеткам является двухступенчатым процессом. Описанные выше гены участвуют в первой стадии — непрочном прикреплении.

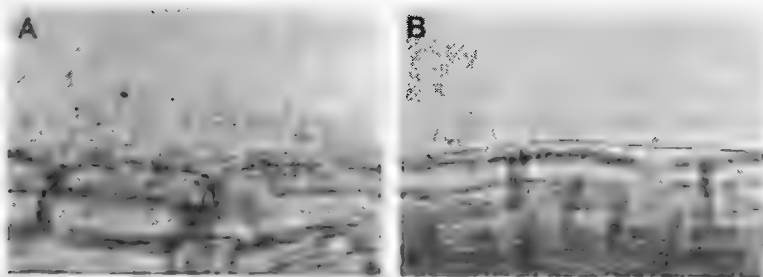


Рисунок 1. Связывание *Agrobacterium tumefaciens* с живыми корнями *Arabidopsis thaliana* (световая микроскопия, оптическая система Nomarski).

А — связывание в присутствии 0.4% сахарозы и 1 mM CaCl_2 (видны многочисленные бактерии, прикрепившиеся к клеткам эпидермиса, сходную картину дает анализ срезов кончиков корней и корневых волосков).

В — ингибирование связывания в присутствии ацетилированного полисахарида, выделенного из бактерий дикого типа.

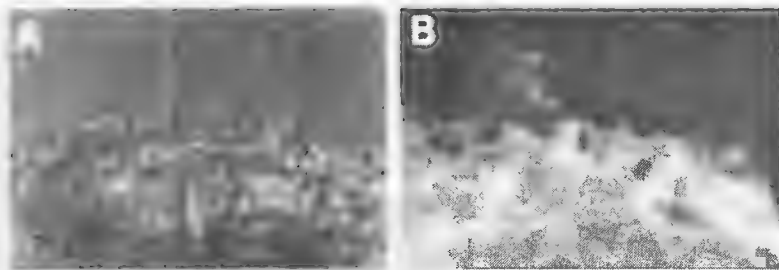


Рисунок 2. Связывание *Agrobacterium tumefaciens* с клетками моркови в суспензионной культуре (А — световая микроскопия, В — сканирующая электронная микроскопия). Видны крупные агрегаты бактерий, скрепленных целлюлозными фибриллами.

На второй стадии бактерии образуют целлюлозные фибриллы, которые могут возникать как до, так и после взаимодействия. При благоприятных условиях эти фибриллы участвуют в прикреплении бактерий к растительным клеткам. Кроме того, целлюлозные фибриллы прочно связаны между собой, так что их синтез обеспечивает необратимую связь бактерий с растительной клеточной стенкой. Кроме того, фибриллы обладают клейкостью и обеспечивают прикрепление свободных бактерий к уже связанным бактериям, что приводит к образованию достаточно крупных клеточных агрегатов на поверхности растительных клеток (Matthysse, 1983; рис. 2).

Гены агробактерий, участвующие в формировании целлюлозы (*celABCDE*), клонированы и секвенированы (Matthysse et al., 1995). Мутанты по этим генам непрочно связываются с растительной клеткой, могут быть удалены при смыве водой и не образуют агрегатов на поверхности растительной клетки. Они слабо связываются с листьями *Bryophyllum daigremontiana* и могут быть удалены уже при осторожном водном смыве (Matthysse, 1983). Эти мутанты сохраняют вирулентность на уровне в 10–1000 раз меньшем, чем у штамма дикого типа (Minnemeyer et al., 1991).

Данные о прикреплении к растительным клеткам других видов агробактерий ограничены. Выявлены, но не охарактеризованы не способные к прикреплению мутанты *A. rhizogenes* (Robertson Crews et al., 1990).

III.В. РИЗОБИИ

Известно лишь две гена ризобий, непосредственно участвующих в прикреплении к растительным клеткам — *ndvA* и *ndvB*, гомологичные генам *chvA* и *chvB* агробактерий. Нарушения этих генов вызывают плеiotропный эффект, связанный с отсутствием β -1,2-глюкана. У *S. meliloti* эти мутанты неспособны инфицировать корни и формировать нормальные по структуре клубеньки (Dylan et al., 1986).

Хорошо изучен мутант *B. japonicum*, неспособный синтезировать адгезин B_j38 (Ho et al., 1990). Этот поверхностный лектин ризобий узнает содержащие галактозу эпитопы поверхности культивируемых клеток сои и может быть связан с фимбриями. Мутанты, дефектные по B_j38, не способны формировать клубеньки на сое (Ho et al., 1993).

У ризобий, как и у агробактерий, вторая стадия прикрепления к растительным клеткам связана с синтезом целлюлозных фибрилл, которые обеспечивают формирование бактериальных агрегатов на растительной поверхности (рис. 3В). Однако, мутанты ризобий, дефектные по образованию фибрилл, сохраняют способность прикрепляться к растительным клеткам и в лабораторных условиях нормально образуют клубеньки (Smith et al., 1987).

Имеются данные о том, что гены ризобий, кодирующие синтез LCO, могут участвовать и в прикреплении к растительным клеткам (Dazzo et al., 1988), что показано путем сравнения кинетики прикрепления у мутантов по *nod*-генам и исходных штаммов. Однако, эти данные еще не доказывают, что LCO являются адгезинами, так как после инокуляции LCO вызывают быстрые

изменения свойств корневых волосков. Если эти изменения стимулируют прикрепление, гомологичные ризобии могут более прочно связываться с поверхностью волосков, чем *nod*-мутанты или гетерологичные штаммы.

IV. Адгезины бактерий

Природу адгезинов, участвующих в первичном прикреплении бактерий к растительным клеточным стенкам, изучают с помощью разных методов. Некоторые из них основаны на эффекте ингибирования, например, на подавлении образования опухолей различными препаратами, полученными из клеток агробактерий (Lippincott, Lippincott, 1969). Было изучено прикрепление бактерий к культивируемым клеткам *A. thaliana* и к корням гороха. Возможными кандидатами на роль ингибиторов прикрепления оказались липополисахариды (ЛПС) и другие поверхностные компоненты, включая К-антигены и белки. Впоследствии эти методики были использованы и для характеристики бактериальных мутантов.

IV.A. АГРОБАКТЕРИИ

Ингибирование образования опухолей на листьях фасоли показало, что бактериальный адгезин содержится в препаратах ЛПС штамма дикого типа (Whately et al., 1976). Эта активность исчезала у бактерий, утративших вирулентность из-за отсутствия плазмиды pSa (New et al., 1983), причем добавление ЛПС к клеточной культуре не влияло на ее связывание с бактериями (Gurlitz et al., 1987). В обоих случаях были использованы грубые препараты ЛПС, которые могли содержать другие поверхностные компоненты, например, К-антигены. Связывание с растительными клетками не нарушалось при действии ингибитора синтеза ЛПС, действие которого подавляло образование его “гладких”, но не “шероховатых” форм (Goldman et al., 1992).

Связывание *A. tumefaciens* с кончиками корневых волосков гороха частично подавлялось экстрактом агробактерий, содержащим поверхностный кальций-связывающий белок рикадгезин с молекулярной массой 14 кДа (Smit et al., 1989). Такой же эффект вызывали препараты рикадгезина, полученные из культур *Rhizobium*. Эти данные свидетельствуют о сходстве механизмов связывания с растительными клетками у различных представителей Rhizobiaceae (рис. 3). Рикадгезин был выявлен у различных представителей Rhizobiaceae, но не у бактерий других семейств. Нельзя исключить, что даже очищенные препараты этого белка содержат небольшое количество поверхностных полисахаридов. Однако активность препаратов исчезает при действии протеаз или повышенной температуры.

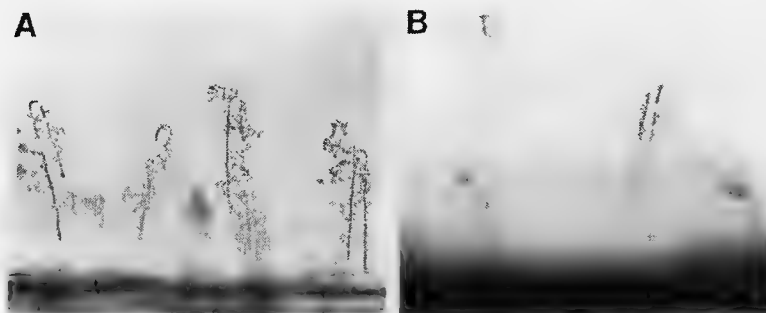


Рисунок 3. Связывание бактерий с корневыми волосками люцерны (свеговая микроскопия, оптическая система Nomarski). А - *Agrobacterium tumefaciens* (корневые волоски не деформированы, бактерии прикреплены по всей их длине). В - *Sinorhizobium meliloti* (корневые волоски деформированы благодаря действию бактериальных Nod-факторов, вблизи концов волосков видны агрегаты бактерий).

Восстановление связывания и вирулентности у бактериальных мутантов было использовано при изучении идентичности бактериальных адгезинов. Интерпретация этих опытов проблематична, поскольку трудно предположить, что вещества, выделенные из клеточных оболочек, займут надлежащее положение на поверхности мутанта. Положительный результат может быть получен лишь в том случае, когда адгезин связывает поверхности взаимодействующих клеток, будучи закреплен на одной из них. Более того, добавляемое вещество может маскировать действие ингибиторов, например, снижая электростатическое отталкивание. И наконец прикрепление мутантов, у которых нарушены стадии взаимодействия, предшествующие прикреплению, может восстанавливаться при действии различных веществ, которые не являются адгезинами. Например, для прикрепления агробактерий необходима группа хромосомных генов (*attA1A2BCDEFGH*), гомологичная транспортным системам ABC-типа. Связывание этих мутантов с растительными клетками восстанавливается при добавлении среды, в которой инкубировали совместно агробактерии и растительные клетки. В этих же условиях наблюдали восстановление связывания мутантов по гену *attD* с морковными дисками. Возможно, что в данной среде присутствуют сигналы, которыми обмениваются бактериальные и растительные клетки перед началом взаимодействия (Matthysse, 1994; Matthysse et al., 1996).

Было подробно изучено связывание мутантов по гену *chvB*, кодирующему синтез β -1,2-глюкана (Castro et al., 1996). Добавление этого глюкана не восстанавливало связывание мутанта с растительными клетками (и не влияло и на адгезию бактерий дикого типа), однако восстанавливалось при добавлении препаратов рикадгезина (Swart et al., 1993). Важно, что этот белок присутствует в препаратах *chvB*-мутантов, но не сохраняет способность ингибировать связывание с корневыми волосками бактерий дикого типа. Возможно, что у данных мутантов нарушен компонент, функционирующий совместно с рикадгезином, например β -1,2-глюкан, добавление которого не влияет на прикрепление вне зависимости от присутствия рикадгезина. Более того, активность рикадгезина и связывание могут быть восстановлены в условиях высокого осмотического давления, хотя при этом формирование β -1,2-глюкана не восстанавливается. В этих условиях для восстановления активности рикадгезина важным является присутствие кальция, который может закреплять, стабилизировать или активировать рикадгезин (Smit et al., 1991). Поскольку высокое осмотическое давление влияет на соотношение, а возможно и на конформацию поверхностных полисахаридов Rhizobiaceae (Breedveld et al., 1990), рикадгезин может активироваться в сочетании с компонентом капсулы.

Все эти данные показывают, что рикадгезин важен для прикрепления агробактерий к корневым волоскам гороха, тогда как ацетилированный К-антиген участвует в адгезии *A. tumefaciens* в суспензионных культурах клеток моркови и на корнях *A. thaliana*.

IV.B. РИЗОБИИ

В качестве адгезинов ризобий могут выступать различные поверхностные компоненты: экзополисахариды (ЭПС), капсулярные полисахариды (КПС), липополисахариды (ЛПС) и поверхностные белки, такие как рикадгезин и B₃₈. ЭПС, КПС и ЛПС могут участвовать в связывании, взаимодействуя с растительными полисахаридами (Toro, Nakamura, 1986) или выступая в качестве лигандов растительных адгезинов (Dazzo, Truchet, 1983). Опыты, основанные на утрате функции, могут оказаться безуспешными для идентификации этих компонентов как адгезинов, поскольку другие полисахариды могут принять на себя функцию утраченного. Показано, что мутанты ризобий, дефектные по синтезу ЭПС или О-антигенов ЛПС, сохраняют способность прикрепляться к кончикам корневых волосков (Smit et al., 1987; Van Workum, 1997).

Предполагается, что поверхностные полисахариды ризобий функционируют как адгезины, являясь лигандами сахаро-связывающих белков (лектинов), находящихся на поверхности корней. Лектин клевера, трифолиин А, находится на периферии корневых волосков и секретируется в ризосферу (Sherwood et al., 1984a). В зависимости от условий, лигандами, связывающими трифолиин А, могут быть ЛПС, КПС или олигосахаридные фрагменты ЭПС, синтезируемые симбионтом клевера — *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Hrabak et al., 1981; Sherwood et al., 1984a; Abe et al.,

1984). Мутанты этих бактерий, лишенные *sum*-плазмиды, неспособны связываться с трифолином А и обладают сниженной активностью прикрепления к корневым волоскам клевера (Dazzo et al., 1988).

В то же время, лишенные *sum*-плазмиды мутанты ризобий гороха (*R. leguminosarum* bv. *viciae*) сохраняют способность связываться с корневыми волосками гороха, причем накопление бактерий на кончиках корневых волосков опосредовано гороховым лектином. Для одного из штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae* лигандом, связывающим лектин гороха, оказался глюкан, ассоциированный с ЛПС (Planque, Kijne, 1977). Различия между биотипами *R. leguminosarum* могут быть обусловлены разными условиями опытов. В случае ризобий клевера микроскопический анализ корневых волосков проводили при рН=6, тогда как для ризобий гороха использовали фосфатный буфер (рН=7.5) в условиях, которые могли вызывать повреждение корневых волосков.

Хотя мутанты ризобий, неспособные синтезировать рикадгезин, описаны не были, считается, что этот белок играет важную роль в прикреплении к корням. Об этом говорят результаты опытов, в которых наблюдали подавление и восстановление прикрепления. На основании полученных данных была предложена модель, согласно которой рикадгезин связан с поверхностью ризобий посредством ионов кальция (Smit et al., 1991). В случае ризобий гороха эта связь была чувствительной к кислоте: при рН=5 рикадгезин освобождался в среду, возможно, благодаря разрушению кальциевого мостика (Swart, 1994). В кислой среде основную роль в прикреплении ризобий к корневым волоскам могут играть поверхностные полисахариды.

В отличие от *chvB*-мутантов агробактерий, *ndvB*-мутанты ризобий люцерны (*S. meliloti*) обладают сниженной активностью прикрепления к корням, не формируют инфекционные нити и индуцируют образование "псевдоклубеньков". Более того, препараты поверхностных компонентов *ndvB*-мутанта содержат рикадгезин, что может быть связано с высокой осмоустойчивостью *S. meliloti* (Breedveld et al., 1990). Многие ризобии продуцируют целлюлозные фибриллы, которые, как и в случае агробактерий, могут функционировать как адгезины. Внесение коммерческих препаратов целлюлозы подавляет прикрепление *R. leguminosarum* bv. *viciae* к кончикам корневых волосков гороха, если их добавить к бактериям перед инокуляцией (Smit et al., 1987). Это может быть связано с агрегацией бактерий, приводящей к уменьшению числа клеток, способных к прикреплению. Дефектные по синтезу целлюлозы мутанты, а также обработанные целлюлозой клетки дикого типа не способны формировать агрегаты на кончиках корневых волосков. Очевидно, что целлюлозные фибриллы ризобий играют более важную роль в связывании бактериальных клеток, чем в их прикреплении к корневым волоскам. Мутанты, образующие повышенное количество фибрилл, интенсивно образуют хлопья, что отличает их от мутантов, дефектных по синтезу фибрилл (Smit et al., 1987).

V. Адгезины растений

Изучение растительных адгезинов основано на ингибировании прикрепления или вирулентности бактерий. Анализ образования опухолей на листьях фасоли показал активную роль одного из производных (возможно метилированного) пектина (Lippincott et al., 1977). Пектиновые фракции томатов подавляли прикрепление бактерий к культивируемым клеткам томатов (Neff et al., 1987), хотя коммерческий пектин не влиял на прикрепление к клеткам моркови (Gurlitz et al., 1987). Поскольку пектины с короткой цепью могут быть элиситорами синтеза фитоалексинов, ингибирующих образование опухолей (Hahn et al., 1981), интерпретация полученных результатов более сложна, чем думали ранее. Хотя активные фракции клеточных стенок томата содержали пектин, активность оказалась чувствительной к протеазам. Обработка клеточной культуры моркови, но не томата, протеиназами, сопровождаемая добавлением избытка ингибитора протеиназ, предотвращала связывание бактерий (Gurlitz et al., 1987). С целью выявления гаптена бактериального или растительного адгезина, была изучена способность подавлять прикрепление при добавлении ряда сахаров и аминокислот, однако такого эффекта обнаружено не было. Для идентификации растительного адгезина было изучено действие различных полисахаридов и белков на прикрепление бактерий. Экстенсин и другие белки растительной клеточной стенки не влияли на прикрепление к ней бактерий.

Рецептор рикадгезина ¹	A-D-A-D-A-L-Q-D-L-C-V-A-D-Y-A-S . V-I-L-V-N-G-F-A-S-K-P
Гермин ²	T-D-P-D-P-L-Q-D-F-C-V-A-D-L-D-G-K-A-V-S-V-N-G-H-T-C-K-P
Псевдогермин ²	A-D-P-D-P-L-Q-D-F-?-V-A-D-L-?-D-N-A-V-?-V

Рисунок 4. Гомология N-терминальных последовательностей предполагаемого рецептора рикадгезина *Rhizobium leguminosarum*, гермина и псевдогермина (1-Swart et al., 1994; 2-Lane et al., 1992).

Изучение экотипов *A. thaliana*, неспособных воспринимать Т-ДНК *A. tumefaciens*, показало, что некоторые из них неспособны связывать клетки агробактерий. Возможно, что именно это является причиной отсутствия у данных растений способности формировать опухоли (Nam et al., 1997).

У растений был выявлен поверхностный белок, сходный с витронектином человека (Zhu et al., 1991; Pressner, 1991). Хотя растительный белок не был очищен, оказалось, что витронектин, а также полученные против него антитела, подавляет прикрепление *A. tumefaciens* к клеткам моркови (Wagner, Matthysse, 1992). Штаммы биотипа 1 связывают радиоактивный витронектин, тогда как неспособные к прикреплению мутанты утрачивают это свойство. Экстракция клеток моркови слабыми растворами Тритона приводит к удалению адгезина (Gurlitz et al., 1987). При этом клетки сохраняют жизнеспособность и восстанавливают способность связывать бактерии в течение 3-6 часов. С использованием методов PAGE было показано, что материал, экстрагированный Тритоном, содержит несколько белков. Путем Вестерн-блоттинга в экстрактах были выявлены 2 фракции, реагирующие с антителами на витронектин (Wagner, Matthysse, 1992), которые являются наиболее вероятными кандидатами на роль адгезина моркови. Однако данные о том, что витонектин-подобные белки являются адгезинами, нельзя считать окончательными, так как кодирующий его ген не клонирован, а степень сходства данного белка с витронектином человека остается неизвестной.

Витронектин человека содержит аминокислотную последовательность RGD, которая участвует в связывании с интегринами, находящимися в плазматической мембране. Трудно предполагать, что эта последовательность расположена на поверхности белка. Однако, добавление гексапептида, содержащего RDG, не влияло на прикрепление *A. tumefaciens* к клеткам моркови и корням арабидопсиса. Остается неясным, содержит ли растительный белок последовательность RDG. Возможно, что ингибирование прикрепления бактерий витонектином или полученными против него антителами связано со стерическим блокированием сайтов адгезии, находящихся вблизи витронектин-подобных белков на клеточной поверхности растений.

В случае ризобий витронектин может играть роль и в прикреплении к растительным клеткам. Этот белок инактивировал рикадгезин *R. leguminosarum* bv. *viceae*, что нарушало связывание с корневыми волосками гороха (Swart et al., 1994). Гексапептид, содержащий последовательность RDG, ингибировал прикрепление *Rhizobium* и *Agrobacterium* к корневым волоскам гороха и супресировал подавление этого процесса рикадгезином. Контрольный пептид, содержащий RDG, не нарушал прикрепление и не влиял на активность рикадгезина.

Активность рикадгезина может подавляться также гликопротеином с молекулярной массой 32 кДа, выделенным из клеточных стенок корней гороха (Swart et al., 1994). Этот гликопротеин не реагирует с поликлональными антителами, полученными на витронектин человека. Предполагаемый адгезин гороха может быть экстрагирован CaCl_2 и связывается с гидроксипатитом. Анализ N-концевой последовательности не позволил выявить гомологий с известными белками, однако позднее было установлено сходство с семейством гермина (рис. 4). Гермин является оксалат-оксидазой из внеклеточного матрикса растений (Lane, 1994), он может быть связан с увеличением растительных клеток, а также присутствовать в растущих корневых волосках. Гермин связан также с полисахаридами гемицеллюлозы, а его гомолог может взаимодействовать с поверхностными полисахаридами ризобий. Однако во всех случаях ингибирование прикрепления ризобий растительны-

ми адгезинами или белками является частичным, и значительное число бактерий связывается с растительной клеточной поверхностью.

Хорошо изученными растительными адгезинами являются лектины — белки, имеющие хотя бы один сайт некаталитического связывания с остатками сахара (Reumans, Van Damme, 1995). Показано, что для связывания с клетками ризобий наиболее важны лектины бобовых, относящиеся к группе Asn-Ca (Kijne et al., 1997). Их присутствие на поверхности корневых волосков выявлено у многих бобовых (Diaz et al., 1996). Локализация лектина гороха (PSL) на поверхности корней, его секрета в ризосферу, вклад в накопление инфекционных клеток ризобий на кончиках корневых волосков, а также возможность связывания с ЭПС, ЛПС и капсулярными гликанами ризобий, согласуется с гипотезой об участии лектинов бобовых в связывании ризобий (Hablín, Kent, 1973). В то же время, окончательная проверка этой гипотезы затрудняется отсутствием мутантов гороха, неспособных продуцировать PSL, а также мутантов ризобий, не связывающих этот лектин.

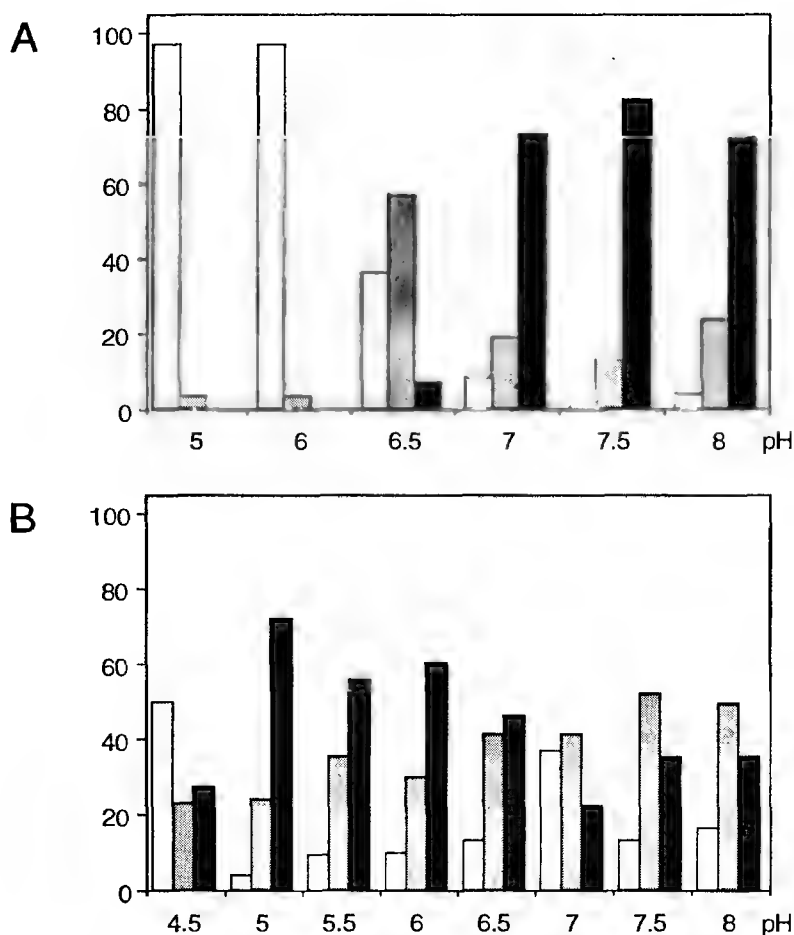


Рисунок 5. Зависимость прикрепления клеток *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, штамм 248 и *Agrobacterium tumefaciens*, штамм LAB1010 к корням гороха от pH (Swart, 1994). Белые столбики — % корневых волосков без бактерий, серые столбики — % волосков с небольшим количеством прикрепленных бактерий, черные столбики — % волосков с большим количеством прикрепленных бактерий, образующих агрегаты.

Данные, полученные при изучении PSII, согласуются с более ранними работами, показавшими, что трифолийин А (лектин клевера) участвует в прикреплении *R. leguminosarum* bv. *trifolii* к корневым волоскам клевера (Dazzo, Truchet, 1983). Однако, этот лектин до сих пор полностью не охарактеризован, а кодирующий его ген не клонирован. Дальнейшего изучения требуют и другие лектины, например, корневой лектин арахиса PRAII (Kalsi et al., 1995).

VI. Факторы среды

Прикрепление бактерий к растительным клеткам находится под влиянием многих внешних факторов. Например, состав культуральной среды влияет на прикрепление *R. leguminosarum* bv. *viciae* к корневым волоскам гороха. Бактерии, лимитированные по углероду и растущие в среде с триптоном и дрожжевым экстрактом (ТУ), активно прикрепляются к кончикам корневых волосков гороха при pH=7.5, но не прикрепляются при pH<6 (Swart, 1994; рис. 5). Однако, ризобии, выращенные в маннитно-дрожжевой среде УМ, лимитированной по марганцу, сохраняют способность прикрепляться к корневым волоскам гороха при pH=6 (хотя оптимальным является pH=7.5). Обычно изучение образования клубеньков проводят в слабокислой среде. Более того, реакция внеклеточного матрикса растущих клеток растений, таких как корневые волоски, является слабокислой. Ризобии, выращенные в среде ТУ, в отличие от ризобий в среде УМ, имеют пониженную инфекционность (Kijne et al., 1988). Это показывает, что: (1) связывание необходимо для инфицирования, (2) ризобии, выращенные в среде ТУ, не могут быть использованы для изучения образования клубеньков, но пригодны для анализа колонизации корней.

Во многих работах показана важная роль кальция для связывания ризобий с корнями бобовых (Caetano-Anolles et al., 1989; Loderio et al., 1995). Однако, некоторые авторы показали усиление связывания при выращивании ризобий в среде, дефицитной по кальцию (Wisniewski, Delmotte, 1996). Кальций и магний могут играть важную роль в закреплении адгезинов на бактериальной поверхности (Swart, 1994) или в регуляции заряда поверхностей бактериальных и растительных клеток. Эти эффекты зависят от кислотности и говорят о важности физико-химических взаимодействий в адгезии.

Клетки *R. leguminosarum* bv. *viciae*, выращенные в условиях ограниченного роста, обладают более высокой активностью прикрепления к корням и вирулентностью, чем клетки, взятые с экспоненциальной фазы роста, что было показано с помощью хемотатных культур (Kijne et al., 1988). Повышенная эффективность прикрепления может быть вызвана голоданием по марганцу, азоту, железу, а также пониженной аэрацией. К сожалению, в многочисленных работах по изучению влияния фазы роста бактериальной культуры на прикрепление не анализировали состав культуральной среды. Остаются неизученными и первичные лимитирующие факторы, которые действуют в почве и ризосфере. Известно лишь, что синтез ризобиями LCO может повышать эффективность прикрепления к корням.

Возможно, что в прикреплении агробактерий к поверхности растительных клеток средовые факторы играют меньшую роль. Прикрепляться могут лишь живые клетки, и различные способы нарушения жизнеспособности агробактерий (высокая температура, УФ-облучение, воздействие антибиотиков или глютаральдегида) нарушают связывание с растительными клетками. Поэтому очевидно, что микроусловия, влияющие на жизнеспособность агробактерий, должны влиять и на их связывание с клетками растений. Возможно, что между жизнеспособными бактериями и растительными клетками происходит обмен сигналами, необходимый для прикрепления.

Связывание агробактерий биотипа I с клетками суспензионной культуры моркови относительно мало зависит от кислотности, присутствия двухвалентных катионов и хелатирующих агентов (Gurlitz et al., 1987). Не удалось выявить влияние состава среды культивирования агробактерий на связывание с корнями арабидопсиса. Выращивание в среде ТУ, благоприятной для конъюгации агробактерий, повышает также эффективность прикрепления к растительным клеткам и образования опухолей. В отличие от ризобий, агробактерии не освобождают со своей поверхности рикадгезин при низких значениях pH (Swart, 1994). Агробактерии, выращенные при pH=5-6, активно связываются с кончиками корневых волосков (рис. 5). При введении в них *sum*-плазмиды они

могут формировать клубеньки. Эти данные показывают, что среда ТУ по-разному влияет на свойства ризобий и агробактерий, и эти микроорганизмы не могут считаться полностью взаимозаменяемыми при переносе Ti^- или *sum*-плазмид.

Связывание с растительными клетками агробактерий биотипа I не требует присутствия кальция или магния. Хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или ЭГТА, не подавляют прикрепление. Не выявлено влияния высокой ионной силы (до 0.25 M NaCl), а также низкой ионной силы на прикрепление. Его кинетика оказалась одинаковой в присутствии 4% сахарозы и в среде MS. Высокое осмотическое давление (0.4 M маннитол) и варьирование pH в пределах 5.5-7.5 также не влияли на прикрепление. Более или менее низкие величины pH вызывали нарушение роста агробактерий и их прикрепления к растительным клеткам (Gurlitz et al., 1987; Sykes, Matthysse, 1988). Варьирование температуры в пределах 20-37°C не влияло на прикрепление, а ее выход за эти пределы нарушал рост и прикрепление бактерий (Matthysse, 1988).

Штаммы *A. tumefaciens* биотипов 2 и 3 оказались более чувствительными к действию факторов среды. Высокая ионная сила (свыше 0.09 M) подавляла прикрепление к растительным клеткам штаммов биотипа 2 и некоторых штаммов биотипа 3, однако при этом нарушался и рост бактерий. Все биотипы агробактерий могут связываться с клетками моркови в присутствии 4% сахарозы. Вещества, секретируемые растениями, более важны для прикрепления агробактериальных клеток, чем состав среды (Sykes, Matthysse, 1988).

VII. Заключение

В настоящее время мы находимся лишь на пороге выявления факторов, влияющих на прикрепление ризобий и агробактерий к растительным клеткам. Необходим дальнейший анализ природы бактериальных и растительных адгезинов, генетического контроля их синтеза, а также связи адгезии с более ранними и более поздними стадиями взаимодействия микроорганизмов и растений.

В то же время, представленные результаты показали, что бактерии сем. Rhizobiaceae продуцируют различные молекулы, необходимые для прикрепления к поверхности растительных клеток. Роль этих компонентов частично определяется условиями среды. Кроме того, адгезины могут участвовать в снижении электростатического отталкивания клеток или в гидрофобных взаимодействиях.

Возможно, что все представители Rhizobiaceae имеют общий базовый механизм прикрепления, связанный с образованием рикадгезина. У ризобий, в отличие от агробактерий, этот механизм является кислото-чувствительным. Дальнейшее взаимодействие с растительными клетками, приводящее к переносу T-ДНК (у агробактерий) или к развитию инфекционных нитей (у ризобий) может быть связано с дополнительными компонентами, среди которых важную роль играют поверхностные полисахариды бактерий. В случае агробактерий эти взаимодействия могут индуцироваться растительными сигналами, в случае ризобий — ограничением питания. Поверхностные полисахариды могут функционировать в качестве адгезинов, связывая растительные белки, такие как витронектин, гомологи гермина или лектины. Ионы кальция и магния могут изменять заряд поверхностных полисахаридов, влияя на их взаимодействие с растительными и бактериальными белками. Взаимосвязь различных механизмов прикрепления может быть изучена лишь после получения бактериальных мутантов, дефектных по синтезу рикадгезина. Различия в механизмах связывания с растительными клетками, выявляемые при действии pH, могут быть обусловлены тем, что для агробактерий результатом прикрепления являются конъюгация с растительными клетками, а для ризобий — инфицирование тканей растения.

VII. Литература

- Abe M., Sherwood J.E., Hollingsworth R.I., Dazzo F.B. (1984) J. Bacteriol. V. 160, p. 517-520.
Akiyoski D.E., Morris R.O., Hinz R., Mishke B.S., Kosuge T., Garfinkel D.J., Gordon M.P., Nester E.W. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 80, p. 407-411.

- Bhuvaneswari T.V., Bhagwat A.A., Bauer W.D. (1981) *Plant Physiol.* V. 68, p. 1144-1149.
- Binns A.N., Thomashow M.F. (1988) *Annu. Rev. Microbiol.* V. 42, p. 575-606.
- Breedveld M.W., Zevenhuizen L.P.T.M., Zehnder A.J.B. (1990) *J. Gen. Microbiol.* V. 136, p. 2511-2519.
- Burr T.J., Reid C.L., Yoshimura M., Momol E.A., Bazzi C. (1995) *Plant Dis.* V. 79, p. 677-682.
- Caetano-Anolles G., Favelukes G. (1986a) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 52, p. 371-376.
- Caetano-Anolles G., Favelukes G. (1986b) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 52, p. 377-382.
- Caetano-Anolles G., Lagares A., Favelukes G. (1989) *Plant and Soil.* V. 117, p. 67-74.
- Cangelosi G.A., Hung L., Puvanesarajah V., Stacey G., Ozaga D.A., Leigh J.A., Nester E.W. (1987) *J. Bacteriol.* V. 159, p. 2086-2091.
- Castro O.A., Zorreguieta A., Ielmini V., Vega G., Ielpi L. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 6043-6048.
- Chilton M.D., Drummond M.H., Merlo D.J., Sciaky D., Montoya A.L., Gordon M.P., Nester E.W. (1977) *Cell.* V. 11, p. 263-271.
- Dazzo F., Hollingsworth R., Philip-Hollingsworth S., Robeles M., Olen T., Salzwedel J., Djordjevic M., Rolfe B. (1988) In: Bothe H. et al. (eds). *Nitrogen Fixation, Hundred Years After*, p. 431-435. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, NY.
- Dazzo F.B., Napoli C.A., Hubbell D.H. (1976) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 32, p. 166-171.
- Dazzo F.B., Truchet G. (1983) *J. Membrane Biol.* V. 73, p. 1-16.
- Diaz C.L., Logman T.J.J., Stam H.C., Kijne J.W. (1996) *Plant Physiol.* V. 109, p. 1167-1177.
- Douglas C.J., Halperin W., Nester E.W. (1982) *J. Bacteriol.* V. 152, p. 1265-1275.
- Dylan T., Ielpi L., Stanfield S., Kashyap L., Douglas C., Yanowsky M., Nester E., Helinski D.R., Ditta G. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 83, p. 4403-4407.
- Fahraeus G. (1957) *J. Gen. Microbiol.* V. 16, p. 374-381.
- Fullner K.J., Lara J.C., Nester E.W. (1996) *Science.* V. 273, p. 1107-1109.
- Gaworzewska E.T., Carlile M.J. (1982) *J. Gen. Microbiol.* V. 128, p. 1179-1188.
- Goldman R.C., Capobianco J.O., Doran C.C., Matthyse A.G. (1992) *J. Gen. Microbiol.* V. 138, p. 1527-1533.
- Gurlitz R.H.G., Lamb P.W., Matthyse A.G. (1987) *Plant Physiol.* V. 83, p. 564-568.
- Hahn M.G., Darvill A.G., Albersheim P. (1981) *Plant Physiol.* V. 68, p. 1161-1169.
- Hamblin J., Kent S.P. (1973) *Nature New Biol.* V. 245, p. 28-29.
- Hawes M.C., Brigham L.A. (1992) *Advances Plant Pathol.* V. 8, p. 119-147.
- Hawes M.C., Smith L.Y. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 5668-5671.
- Heidstra R., Geurts R., Franssen H., Spaink H.P., Van Kammen A., Bisseling T. (1994) *Plant Physiol.* V. 105, p. 787-797.
- Ho S.-C., Schindler M., Wang J.L. (1990) *J. Cell Biol.* V. 111, 1639-1643.
- Ho S.-C., Wang J.L., Schindler M., Loh J. (1993) In: Palacios R. et al. (eds). *New Horizons in Nitrogen Fixation*, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, p. 237.
- Ho S.-C., Ye W., Schindler M., Wang J.L. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 3882-3890.
- Hooykaas P.J.J., Klapwijk P.M., Nuti M.P., Schilperoort R.A., Rorsch A. (1988) *J. Gen. Microbiol.* V. 98, p. 477-484.
- Hooykaas P.J.J., Van Brussel A.A.N., Den Dulk-Ras H., Van Slogteren G.M.S., Schilperoort R.A. (1981) *Nature.* V. 291, p. 351-353.
- Hrabak E.M., Urbano M.R., Dazzo F.B. (1981) *J. Bacteriol.* V. 148, p. 697-711.
- Kado C.I. (1994) *Mol. Microbiol.* V. 12, p. 17-22.
- Kalsi G., Babu C.R., Das R.H. (1995) *Glycoconjugate. J.* V. 12, p. 45-50.
- Kijne J.W., Bauchrowitz M.A., Diaz C.L. (1997) *Plant Physiol.* V. 115, p. 869-873.
- Kijne J.W., Smit G., Diaz C.L., Lugtenberg B.J.J. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 2994-3000.
- Klee H.J., White F.F., Iyer V.N., Gordon M.P., Nester E.W. (1983) *J. Bacteriol.* V. 153, p. 878-883.
- Lane B.G. (1994) *FASEB J.* V. 8, p. 294-301.
- Lane B.G., Cuming A.C., Fregeau Carpita N.C., Hurkman W.J., Bernier F., Dratewka-Kos E., Kennedy T.D. (1992) *Europ. J. Biochem.* V. 209, p. 961-969.
- Leigh J.A., Walker G.C. (1994) *Trends in Genetics.* V. 10, p. 63-67.
- Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Prome J.C., Denarie J. (1990) *Nature.* V. 344, p. 781-784.
- Lessi M., Lanka E. (1994) *Cell.* V. 77, p. 321-324.
- Lippincott B.B., Lippincott J.A. (1969) *J. Bacteriol.* V. 97, p. 620-628.
- Lippincott B.B., Whately M.H., Lippincott J.A. (1977) *Plant Physiol.* V. 59, p. 388-390.
- Lodeiro A.R., Lagares A., Martinez E.N., Favelukes G. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 61, p. 1571-1579.
- Matthyse A.G. (1983) *J. Bacteriol.* V. 154, p. 906-915.
- Matthyse A.G. (1986) *CRC Crit. Rev. Microbiol.* V. 13, p. 281-307.
- Matthyse A.G. (1988) In: Palacios R., Verma D.P.S. (eds). *Molec. Genet. Plant-Microbe Interact.* APS Press, Minneapolis, p. 63-68.
- Matthyse A.G. (1994) *Protoplasma.* V. 183, p. 131-136.
- Matthyse A.G. (1995) In: *Methods in Enzymology.* Academic Press, San Diego, CA, p. 189-206.
- Matthyse A.G. (1996) In: Fletcher M., Savage D. (eds). *Molec. Ecol. Divers. Bacter. Adhes.* John Wiley & Sons, Inc. NY, p. 129-153.
- Matthyse A.G., Lightfoot R., White S. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 1069-1075.
- Matthyse A.G., Wyman P.M., Holmes K.V. (1978) *Infect. Immun.* V. 22, p. 516-522.
- Matthyse A.G., Yarnall H.A., Young N. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 5302-5308.
- Minnemeyer S.L., Lightfoot R., Matthyse A.G. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 7723-7724.

- Nam J., Matthysse A.G., Gelvin S. (1997) *Plant Cell*. V. 9, p. 317-333.
- Neff N.T., Binns A.N., Brandt C. (1987) *Plant Physiol*. V. 83, p. 525-528.
- New P.B., Scott J.J., Ireland C.R., Farrand S.K., Lippincott B.B., Lippincott J.A. (1983) *J. Gen. Microbiol*. V. 129, p. 3657-3660.
- Ohyama K., Pelcher L.E., Schaefer A., Fowkes L.C. (1979) *Plant Physiol*. V. 63, p. 382-387.
- Peumans W.J., Van Damme E.J.M. (1995) *Plant Physiol*. V. 109, p. 347-352.
- Planque K., Kijne J.W. (1977) *FEBS Lett*. V. 73, p. 64-66.
- Pohlman R.F., Genetti H.D., Winans S.C. (1994) *Mol. Microbiol*. V. 14, p. 655-668.
- Pressner K.T. (1991) *Annu. Rev. Cell. Biol*. V. 7, p. 275-310.
- Puvanesarajah V., Schell P.M., Stacey G., Douglas C.J., Nester E.W. (1985) *J. Bacteriol*. V. 164, p. 102-106.
- Reuhs B.L., Kim J.S., Matthysse A.G. (1997) *J. Bacteriol*. V. 179, p. 5372-5379.
- Robertson Crews J.L., Colby S., Matthysse A.G. (1990) *J. Bacteriol*. V. 172, p. 6182-6188.
- Sanders L., Wang C., Walling L., Lord E. (1991) *Plant Cell*. V. 3, p. 629-635.
- Sherwood J.E., Truchet G., Dazzo F.B. (1984a) *Planta*. V. 162, p. 540-547.
- Sherwood J.E., Vasse J.M., Dazzo F.B., Truchet G. (1984b) *J. Bacteriol*. V. 159, p. 145-152.
- Smit G., Kijne J.W., Lugtenberg B.J.J. (1986) *J. Bacteriol*. V. 168, p. 821-827.
- Smit G., Kijne J.W., Lugtenberg B.J.J. (1987) *J. Bacteriol*. V. 169, p. 4294-4301.
- Smit G., Logman T.J.J., Boerrigter M.E.T.L., Kijne J.W., Lugtenberg B.J.J. (1989) *J. Bacteriol*. V. 171, p. 4054-4062.
- Smit G., Swart S., Lugtenberg B.J.J., Kijne J.W. (1992) *Mol. Microbiol*. V. 6, p. 2897-2903.
- Smit G., Tubbing D.M.J., Kijne J.W., Lugtenberg B.J.J. (1991) *Arch. Microbiol*. V. 155, p. 278-283.
- Spaink H.P., Sheeley D.M., Van Brussel A.A.N., Glushka J., York W.S., Tak T., Geiger O., Kennedy E.P., Reinhold V.N., Lugtenberg B.J.J. (1991) *Nature*. V. 354, p. 125-131.
- Swart S. (1994) Rhicadhesin-mediated attachment of Rhizobiaceae. PhD Thesis, Leiden University, The Netherlands.
- Swart S., Logman T.J.J., Smit G., Lugtenberg B.J.J., Kijne J.W. (1994) *Plant Mol. Biol*. V. 24, p. 171-183.
- Swart S., Smit G., Lugtenberg B.J.J., Kijne J.W. (1993) *Mol. Microbiol*. V. 10, p. 597-605.
- Sykes L., Matthysse A.G. (1988) *Phytopathology*. V. 78, p. 1322-1326.
- Tako M., Nakamura S. (1986) *FEBS Lett*. V. 204, p. 33-36.
- Tempe J., Petit A., Farrand S.K. (1984). In: Verma D.P.S., Hohn T. (eds). *Genes Involved in Microbe Plant Interactions*. Springer Verlag, NY, p. 271-286.
- Terouchi N., Syono K. (1990) *Plant Cell Physiol*. V. 31, p. 119-127.
- Thomashow M.F., Karlinsky J.E., Marks J.R., Hurlburt R.E. (1987) *J. Bacteriol*. V. 169, p. 3209-3216.
- Van Brussel A.A.N., Bakhuizen R., Van Spronsen P.C., Spaink H.P., Tak T., Lugtenberg B.J.J., Kijne J.W. (1992) *Science*. V. 257, p. 70-72.
- Van Workum W.A.T. (1994) Biosynthesis and function of exopolysaccharides from *Rhizobium leguminosarum*. PhD Thesis, Leiden University, the Netherlands.
- Wagner V.T., Matthysse A.G. (1992) *J. Bacteriol*. V. 174, p. 5999-6003.
- Whately M.H., Bodwin J.S., Lippincott B.B., Lippincott J.A. (1976) *Inf. Immun*. V. 13, p. 1080-1083.
- Wisniewski J.-P., Delmotte F.M. (1996) *Can. J. Microbiol*. V. 42, p. 234-242.
- Zhu J., Shi J., Sing U., Carpita N.C. (1991) *Plant Physiol*. V. 96, p. 10.
- Zorregueta A., Geremia R.A., Cavaignac S., Cangelosi G.A., Nester E.W., Ugalde R.A. (1988) *Mol. Plant-Microbe Interact*. V. 1, p. 121-127.

Онкогены агробактерий

Биннс А.Н., Костантино П.

I. Корончатые галлы и волосатые корни – болезни опухолевого (неопластического) роста.....	275
I.A. История.....	275
I.B. Ti- и Ri- плазмиды.....	278
I.B.1. Ti-плазмиды и T-ДНК.....	278
I.B.2. Ri-плазмиды и T-ДНК.....	279
II. Онкогены T-ДНК.....	278
II.A. Онкогены Ti-плазмиды.....	279
II.A.1. История открытия и генетика.....	279
II.A.2. Биохимия белковых онкогенов Ti-плазмид.....	280
II.A.3. Действие онкогенов в трансгенных растениях.....	281
II.B. Онкогены Ri T-ДНК.....	281
II.B.1. История открытия и анализ <i>rol</i> и других генов Ri-плазмид.....	281
II.B.2. Действие генов Ri T-ДНК в трансгенных растениях.....	283
II.B.3. Функции продуктов Ri-генов.....	283
III. Взаимодействие агробактериальных и растительных онкогенов.....	284
III.A. Роль растения-хозяина в определении фенотипа опухоли.....	284
III.A.1. Ответ на ранение.....	284
III.A.2. Комплементация растением мутаций в онкогенах T-ДНК.....	284
III.A.3. Клеточные <i>rol</i> -гены.....	285
III.B. Регуляция агробактериальных онкогенов в растениях.....	286
III.B.1. Онкогены Ti-плазмид.....	286
III.B.2. Онкогены Ri-плазмид.....	287
IV. Заключительные замечания.....	288
V. Литература.....	288

I. Корончатые галлы и волосатые корни – болезни опухолевого (неопластического) роста

I.A. ИСТОРИЯ

Вирулентные штаммы *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes* индуцируют неограниченный опухолевый рост на чувствительных к заражению растениях, в основном относящихся к двудольным. В большинстве случаев *A. tumefaciens* индуцирует неорганизованные опухоли, называемые «корончатыми галлами», потому что они образуются чаще всего в области корневой шейки, хотя некоторые штаммы могут индуцировать и тератомы, которые представляют собой хаотичный набор из различных частей растения (рис. 1). В результате заражения *A. rhizogenes* в месте инфекции образуются «волосатые корни» (рис. 2).

Смит и Тоунсенд (Smith, Townsend, 1907) впервые показали, что в соответствии с постулатами Коха, *A. tumefaciens*, названная тогда *Bacterium tumefaciens*, несет инфекционный фактор, приводящий к болезни «корончатый галл». Позднее Рикер с соавторами (Ricer et al., 1930) пока-



Рисунок 1. Тератома, индуцированная на стебле каланхос (*Kalanchoe daigremontiana*) штаммом Т37 *A.tumefaciens* (фото проф. Armin C. Braun).

зали, что причиной болезни «волосатые корни» является *A. rhizogenes*. Долгое время ученые считали, что для роста опухоли требуется постоянное присутствие бактерий (Braun, 1922). Однако, в течение 1940-х годов были получены результаты, которые изменили точку зрения на формирование растительных опухолей.

Во-первых, во «вторичных опухолях», которые возникают дистальнее места инфекции, несмотря на интенсивные попытки, не удалось найти бактерий (White, Braun, 1942). Однако такие опухоли способны продолжать неограниченный рост при прививках на здоровые растения, формируя новую опухоль, также свободную от бактерий. Авторы заключили, что индукция опухоли типа «корончатый галл» в месте инфекции является результатом подлинной трансформации. Во-вторых, заражение декапитированных растений ослабленным штаммом A66 (Hendrickson et al., 1934) не приводит к заболеванию (Braun, Laskaris, 1942). Однако если на место декапитации поместить ланолиновую пасту с ауксином, то происходит формирование крупной опухоли.



Рисунок 2. Волосатые корни, индуцированные *A. rhizogenes* на стебле каланхос (*Kalanchoe daigremontiana*).

Исследователи предположили, что процесс опухолеобразования складывается из двух фаз - начальной и фазы развития. Авторы предположили, что ослабленные штаммы дефектны именно по фазе развития. Как было показано позднее, эти штаммы являются мутантными и содержат инсерцию в одном из агробактериальных онкогенов (Binns et al., 1982). В-третьих, на основе детальных опытов по инокуляции растений через определенные промежутки времени после ранения выяснилось, что бактерия способна индуцировать опухоли только в течение первых нескольких дней (Riker, 1926; Braun, Mandle, 1948). При этом *A. tumefaciens* не может индуцировать опухоль при $t > 30^{\circ}\text{C}$, хотя оба партнера способны расти при этой температуре. При воздействии высоких температур через определенные промежутки времени после инокуляции вирулентными штаммами выяснилось, что для индукции опухоли бактерии требуется около 36 часов пермиссивной температуры (Braun, Mandle, 1948).

На основе полученных данных было выдвинуто предположение о том, что бактерии содержат «опухолеиндуцирующий фактор» (Tumor Inducing Principle - TИP), который перемещается в растительные клетки в течение приблизительно 36 часов (точнее, между 24 и 96 часами) после инфекции в месте ранения. На основе данных о том, что в некоторых случаях возможна реверсия к опухолевому состоянию, возникло предположение о том, что TИP может самореплицироваться в растительной клетке независимо от ее хромосомы (Braun, 1951, 1959). Хотя последнее утверждение оказалось не совсем точным, впечатляющие эксперименты Брауна, проведенные в 40-50-х годах, явились основой для изучения агробактериальной трансформации.

Несколько позднее была проведена серия биохимических опытов, которые привели к пониманию природы TИP. Оказалось, что опухоли продуцируют необычные конъюгаты аминокислот с сахарами, позже названные опидами, которые в норме у растений отсутствуют (Tempe, Goldmann, 1982). Тип опинов, продуцируемых опухолью, определялся штаммом бактерий, но не растением (Goldmann et al., 1968; Petit et al., 1970). Например, штамм В6 индуцирует в опухоли синтез октопина, а штамм Т37 - опухоли, содержащие нопалин, независимо от изучаемого вида растений. Возникло представление о том, что TИP несет генетическую информацию, которая передает-

ся от бактерии к растению, и что эта информация варьирует от бактерии к бактерии и определяет, по меньшей мере, тип продуцируемых опинов. Подробное описание опинов и их значимость для бактерии обсуждается в других главах этой книги.

1.B. TИ- И RИ-ПЛАЗМИДЫ

1.B.1. TИ-плазмиды и T-ДНК

В ходе изучения природы TИР было показано, что перенос фактора вирулентности происходит и между бактериями. При введении в опухоль, индуцированную изначально вирулентным штаммом, дополнительных авирулентных бактерий, было показано, что они могут приобретать способность к индукции опухоли, так же как и тип продуцированных опинов, характерный для исходного вирулентного штамма (Kerr, 1969). Другой важный факт заключался в том, что воздействие высокой температурой подавляло способность индуцировать опухоли у штаммов C58 и Ach5. Известные факты того, что генетический перенос между бактериями чаще всего осуществляется за счет конъюгативных плазмид, и что воздействие высокими температурами в некоторых случаях приводит к утере бактериями плазмид, стимулировало поиск плазмид, которые контролируют вирулентность. Результатом этого стало выявление у вирулентных штаммов крупных (>200 т.п.н.) плазмид, перенос которых в авирулентные штаммы сообщал им способность формировать опухоли (Zaenen et al., 1974; van Larebeke et al., 1975; Watson et al., 1975).

Таким образом, оказалось, что TИР, кодируется внехромосомным генетическим элементом, названным TИ-плазмидой. Возник вопрос о том, переносится ли в растительные клетки вся TИ-плазида или только TИР. С использованием метода гибридизации по Саузерну было показано, что TИ-плазида полностью не переносится в растительные клетки, а передается только небольшая ее часть, названная T-ДНК (от англ.: transfer DNA) (Chilton et al., 1977). Таким образом, оказалось возможным использовать метод Саузерн-гибридизации для выявления бактериальной T-ДНК в растениях (Lemmers et al., 1980; Thomashow et al., 1980). Выяснилось, что T-ДНК из октопиновых плазмид обычно интегрируется в геном растения как два независимых участка TL-ДНК и TR-ДНК, тогда как T-ДНК нопалиновых плазмид интегрируется единым фрагментом. При этом различные штаммы агробактерий индуцируют опухоли, которые содержат разные опины, а сама T-ДНК включает консервативный и неконсервативный районы, и в октопиновой TИ-плазмиде консервативный район находится в пределах только T-ДНК (Chilton et al., 1978; Depicker et al., 1978). Сегодня мы знаем, что гены консервативных районов кодируют белки, необходимые для опухолевого роста, тогда как гены в неконсервативных районах кодируют ферменты синтеза опинов (глава 9).

1.B.2. RИ-плазмиды и T-ДНК

Попытки разгадать механизм индукции корнеобразования *A. rhizogenes* были сделаны намного позже, чем работы с «корончатыми галлами». Хотя ранние опыты показали, что «волосатые корни» можно индуцировать бесклеточными филтратами *A. rhizogenes* (Hopkins, Durbin, 1972), в более поздних работах на этой системе были получены факты, показывающие, что молекулярный механизм индукции синдрома «волосатые корни» подобен тому, который описан для «корончатых галлов». Удалось показать перенос из *A. rhizogenes* к *A. tumefaciens* фактора, индуцирующего рост корней, путем конъюгации *in planta* (Kerr, 1969; Albinger, Beiderbeck, 1977). Это значит, что фактор вирулентности и в этом случае локализован на плазмиде. Вовлечение в индукцию синдрома «волосатый корень» плазмиды, первоначально названной Hr (от: hairy root), было впоследствии подтверждено рядом авторов (Moore et al., 1979; White, Nester, 1980).

С использованием методов электрофореза в полиакриламидном геле, а также электронной микроскопии, было показано, что все вирулентные штаммы *A. rhizogenes* содержат плазмиды размером 98-190 МДа, сравнимые по размеру с TИ-плазмидами (Costantino et al., 1981). В то же время, маннопин (один из опинов) был обнаружен в «волосатых корнях» (Tepfer, Tempe, 1981), и это убедительно доказало, что молекулярный механизм индукции «опухолевых корней» действительно основан на переносе T-ДНК. С помощью метода Саузерн-гибридизации было доказано, что «волосатые корни» содержат T-ДНК из плазмиды вирулентности *A. rhizogenes* (Chilton et al.,

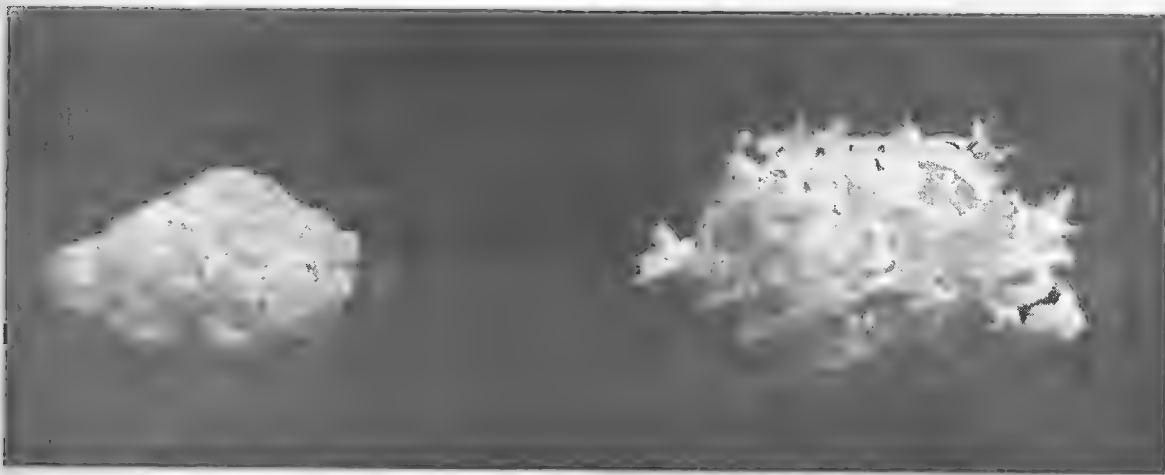


Рисунок 3. Клонированные опухолевые линии табака, трансформированные октопиновыми штаммами *A. tumefaciens* дикого типа (слева) и мутантным штаммом (справа), индуцирующим фенотип «shooty» (побеговый), растущие *in vitro* на среде без фитогормонов.

1982; Spano et al., 1982; White et al., 1982; Willmitzer et al., 1982). Эти плазмиды были названы Ri (root inducing - индуцирующие корни).

Впоследствии, при характеристике Ri Т-ДНК из штаммов, которые индуцировали синтез маннопина (pRi8196) или кукумопина (pRi2659) было показано, что трансгенные корни содержат единый фрагмент Т-ДНК длиной от 15 (core T-DNA) до 30 (extended T-DNA) т.п.н. (Byrne et al., 1983; David, Tempe, 1987). Т-ДНК из плазмид агропинового типа (pRi1855, pA4, p15834) состояла из двух фрагментов, обозначенных TL и TR, которые обычно встраивались в геном растения независимо (Huftman et al., 1984; De Paolis et al., 1985). Гены, индуцирующие рост корней, локализованы во фрагменте TL-ДНК, тогда как гены синтеза агропина и ауксина - в TR-ДНК. Последние две функции отсутствуют у маннопиновых и кукумопиновых Т-ДНК. Все эти типы Т-ДНК имеют два консервативных района, разделенных множеством небольших участков. Сравнение TL-ДНК агропиновых плазмид и Т-ДНК маннопиновых и кукумопиновых плазмид показало наличие 2 консервативных районов, разделенных вариабильным участком (Filetici et al., 1987; Brevet et al., 1988).

II. Онкогены Т-ДНК

II.A. ОНКОГЕНЫ ТI-ПЛАЗМИДЫ

II.A.1. История открытия и генетика

Для проведения генетического анализа была получена серия мутаций в консервативном и вариабильном районах Т-ДНК, которые изменяют морфологию и биохимию опухоли (Garfinkel et al., 1981; Ooms et al., 1981; Leemans et al., 1982) (рис. 3). Например, трансформация табака мутантными штаммами приводила к фенотипам «shooty» или «rooty» (побеговые или корневые) опухоли, которые сохранялись при культивировании *in vitro* (Ooms et al., 1981; Binns et al., 1982; Leemans et al., 1982). Были выявлены два гена, мутации в которых приводят к фенотипу «shooty» - *tms* (tumor morphology shooty) и ген *tmr* (tumor morphology rooty), мутация по которому способствуют развитию опухолей с корнями - «rooty» фенотип. Штаммы, несущие мутации в локусах «shooty» и «rooty», были авирулентны, хотя перенос Т-ДНК у них происходит и в месте ранения обнаруживается синтез опинов (Hille et al., 1983; Ream et al., 1983). На основе данных о роли

цитокининов и ауксинов в морфогенезе и делении клеток при выращивании тканей табака *in vitro* (Skoog, Miller, 1957), а также о гормонезависимом росте опухолевых тканей *in vitro* (Braun, 1958), было сделано предположение о том, что эти гены или участвуют в синтезе растительных гормонов или увеличивают чувствительность к ним растительных тканей. В соответствии с этой гипотезой, при культивировании «shooty» трансформантов на среде с ауксином побегов не формировались (Binns et al., 1982). Это согласуется с тем, что опухоли, полученные в результате трансформации штаммами дикого типа, при их культивировании на среде без гормонов обычно содержат большое число нетрансформированных клеток, тогда как «shooty» опухоли имеют много трансформированных клеток (Binns et al., 1982; van Slogteren et al., 1983). По-видимому, трансформанты дикого типа, продуцирующие гормоны, могут «кормить» не трансформированные клетки, причем у мутантов эта способность редуцирована. Аналогично, опухоли, индуцированные штаммом, несущим мутацию в гене *tmr*, плохо росли *in vitro* на среде без цитокинина (Binns, 1983). И, наконец, анализ уровня гормонов показал, что трансформанты дикого типа имели высокий уровень ауксина и цитокинина, тогда как уровень ауксина был редуцирован в «shooty» опухолях, а уровень цитокинина - в «tooty» опухолях (Akiyoshi et al., 1983; van Onckelen et al., 1984). Более поздние исследования подтвердили, что аккумуляция растительных гормонов контролируется Т-ДНК и определяет опухолевый рост и фенотип трансформированных клеток.

II.A.2. Биохимия белковых онкогенов Ti-плазмид

Поскольку описанные мутанты агробактерий были получены с помощью транспозонового мутагенеза, гены ауксинового и цитокининового биосинтеза вскоре были клонированы и секвенированы (рис. 4). Эти гены характеризуются низким уровнем экспрессии, не содержат интронов, их транскрипты (мРНК) полиаденилированы (Willmitzer et al., 1982b, 1983). Было показано, что два гена участвуют в биосинтезе ауксина (*tms1/gen1* и *tms2/gen2*) и кодируют два последовательных этапа. Продуктом гена *iaaM* (*tms1*) является триптофанмонооксигеназа, которая превращает триптофан в индол-3-ацетамид (Thomashow et al., 1986; Van Onckelen et al., 1986). Затем индолацетамид гидролизруется до индолилуксусной кислоты ферментом индолил-3-ацетамидгидролазой - продуктом гена *iaaH* (*tms2*) (Inze et al., 1984; Schroder et al., 1984; Thomashow et al., 1984). Эти результаты были удивительны, так как такой путь биосинтеза ауксина неизвестен у высших растений, но был выявлен у патогенных штаммов *Pseudomonas*, которые индуцируют гиперпластический рост у растений (Yamada et al., 1985). Ген *tmr/gen4* (*ipt*) участвует в биосинтезе цитокинина и кодирует диметилаллилпирогенфосфат (ДАПФ)-трансферазу (или изопентенил-трансферазу) (Akiyoshi et al., 1984; Barry et al., 1984; Buchmann et al., 1985). Этот фермент катализирует превращение 2-изопентенил-пирогенфосфата и АМФ в изопентенил-АМФ, который быстро превращается в активные цитокинины ферментами растений (Binns, 1994). Гомологичные гены, кодирующие *ipt*-подобные ферменты, были найдены у разных патогенных бактерий (Crespi et al., 1992; Lichter et al., 1995). По-видимому, гены биосинтеза ауксина и цитокинина были каким-то образом приобретены агробактериями и модифицированы для экспрессии в растительных клетках.

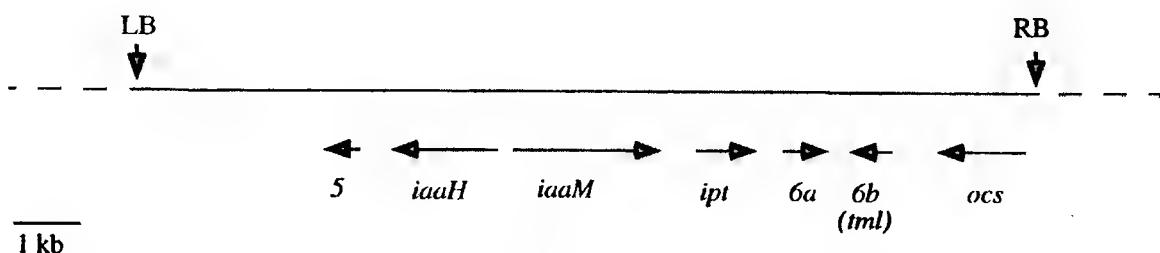


Рисунок 4. Карта района TL-ДНК октопиновой плазмиды pTiA6, иллюстрирующая локализацию и ориентацию некоторых онкогенов, а также генов синтеза октопина (*ocs*), левую и правую границы (LB, RB) Т-ДНК.

Потребовалось около 40 лет для того, чтобы объяснить роль онкогенов агробактерий, кодирующих биосинтез ауксина и цитокинина. Штаммы, несущие только эти три гена, могут индуцировать формирование опухоли дикого типа у большинства растений (Inze et al., 1984). Тем не менее, многие функции Ti-плазмид остаются неясными. Например, неясна биохимическая функция гена *tml/gen6* (tumor morphology large) октопиновой Ti-плазмиды, мутация в котором приводит к формированию крупных опухолей (Ream et al., 1983). Некоторые авторы полагают, что этот ген контролирует гормончувствительность, а иногда и гормоннезависимость (Hooykaas et al., 1988; Spanier et al., 1989; Tinland et al., 1989; Wabiko, Minemura, 1996). Мутации в «гене 5» приводят к усилению фенотипа, вызываемого мутациями по генам *tms*, и способствуют увеличению побегообразования (Leemans et al., 1982). Показано, что *ген 5* кодирует индоллактатсинтазу, но физиологическая роль индолил-3-лактата неясна. Попытки доказать роль этого соединения как антагониста ауксина привели к негативным результатам (Korber et al., 1991; Sprunck et al., 1995).

II.A.3. Действие онкогенов в трансгенных растениях

Для идентификации и функциональной характеристики ауксиновых и цитокининовых генов в нескольких лабораториях были получены трансгенные растения, содержащие эти гены. Использовали различные промоторы - температуререгулируемые, тканеспецифичные, индуцируемые гормонами и ранением или специфичные для определенной стадии онтогенеза (Smigocki, Owens, 1988; Medford et al., 1989; Schmulling et al., 1989a; Estruch et al., 1991c; Smart et al., 1991; Smigocki, 1991; Li et al., 1992; Gan, Amasino, 1995). Данные этих опытов в основном согласовались с результатами воздействия экзогенных гормонов на целые растения или их части. Например, экспрессия гена *ipt* приводила к потере апикального доминирования, задержке старения и нарушению цветения. Растения со сверхэкспрессией гена *iaaM*, продуцирующие большое количество индол-3-ацетамида, характеризовались теми же признаками, что и при использовании экзогенного ауксина: формирование адвентивных корней, наличие апикального доминирования, утолщенный стебель (Klee et al., 1987). Проявление такого эффекта являлось результатом сверхпродукции ауксина, который появлялся в результате нетипичной для растения конверсии растительной амидогидролазой индол-3-ацетамида в ИУК. Если введение генов *iaaM* и *ipt* в растения приводило к ожидаемому фенотипу, то при использовании генов *5* или *6b (tml)* результаты были менее ясными. Результаты трансформации листьев *Nicotiana tabacum* конструкцией с геном *6b* показали, что этот ген вовлечен в органогенез (Wabiko, Minemura, 1996). Трансгенные растения имели дефекты, характерные для растений с повышенной активностью цитокинина, но его уровень изменен не был. Можно предположить, что ген *6b* вовлечен в последний этап передачи цитокининового сигнала. Использование разных Ti-плазмид, содержащих этот ген, показало, что он редуцирует цитокининовую активность или препятствует ее проявлению (Spanier et al., 1989; Tinland et al., 1989).

II.B. ОНКОГЕНЫ Ri T-ДНК

II.B.1. История открытия и анализ *rol* и других генов Ri-плазмид

Как говорилось ранее, TR-ДНК агропиновой Ri-плазмиды содержит локус *aux*, контролирующий биосинтез ауксина, гомологичный генам *iaaM* и *iaaH* Ti-плазмид (Huffman et al., 1984; De Paolis et al., 1985). Присутствие генов *aux* первоначально было неверно истолковано и связано с феноменами корнеобразования. Т-ДНК Ri-плазмид считалась сходной с Т-ДНК мутантов по гену *tmr*, а они характеризуются сверхпродукцией ауксина, что и приводит к формированию корней из инфицированных клеток. У маннопиновых и кукумопиновых штаммов Т-ДНК не содержит генов *aux*, но при трансформации ими у большинства растений формируются корни. Следует отметить, что на некоторых растениях вирулентность маннопиновых и кукумопиновых штаммов очень низка. В ходе комплементационного анализа показана эквивалентность генов *aux* Ri-плазмиды и генов *iaa* Ti-плазмиды (Offringa et al., 1986). Более того, TR-ДНК может индуцировать формирование опухолей на декапитированных проростках гороха.

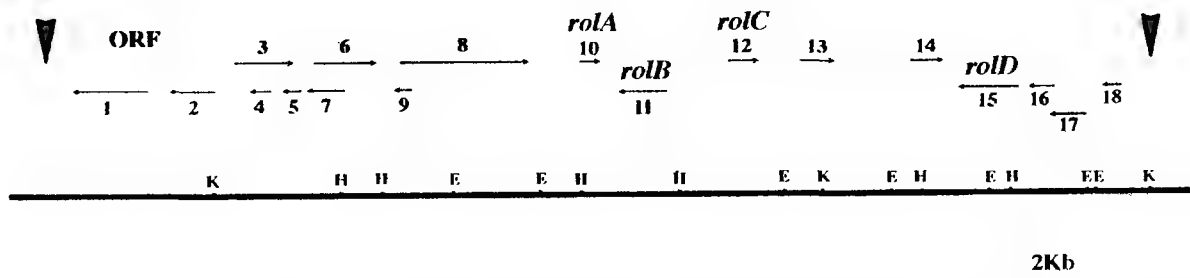


Рисунок 5. Карта ТЛ-ДНК плазмиды агропинового типа pRi1855, показывающая локализацию и ориентацию генов *rol*. Стрелками указаны границы Т-ДНК.

Роль *aux* и генов ТЛ-ДНК изучена в опытах по трансформации растений штаммами *A. rhizogenes*, содержащими Ri-плазмиды с различными генами Ri. Оказалось, что гены *aux* чаще играют вспомогательную роль при индукции корнеобразования, обеспечивая ауксином те растения, у которых эндогенный уровень гормона лимитирован. Ауксин является триггером дифференцировки у них корней, действуя на клетки, так или иначе отвечающие на ауксин в присутствии ТЛ-ДНК (Cardarelli et al., 1987a). Индукция корней не является результатом явного дисбаланса ауксина, а детерминанты Ri-плазмид, индуцирующие формирование неопластических корней, отличаются от тех, которые индуцируют «корончатые галлы». Гены ТЛ-ДНК, индуцирующие синдром «бородатого корня» не имеют гомологии с Ti Т-ДНК (Risuleo et al., 1982; Huffman et al., 1984). Путем транспозонного (Tn5) мутагенеза удалось выявить в ТЛ-ДНК агропиновых плазмид четыре локуса (*rolA, B, C, D*, от: root loci), которые участвуют в индукции и росте волосатых корней (White et al., 1985; рис. 5).

Однако генетический анализ не позволил интерпретировать данные о роли генов Ri Т-ДНК так легко, как это было сделано при анализе мутантов по Ti Т-ДНК. Полученные трансформанты или не формировали корней (когда *rolB* инактивирован) или формировали модифицированные корни (*rolA, C* и *D*), что невозможно интерпретировать в рамках ауксин-цитокининовых взаимодействий, описанных для Ti-плазмидных мутантов. Анализ ТЛ-ДНК агропиновой плазмиды, размером 21 т.п.н. позволил выявить 18 открытых рамок считывания (Slighton et al., 1986). Среди них были *ORF10, 11, 12* и *15*, которые соответствовали генам *rolA, B, C* и *D*. Генетический анализ индукции «волосатых корней» показал, что сегмент Ri Т-ДНК, включающий только *rolA, B*, и *C* является наиболее эффективным для формирования неопластических корней по сравнению с целым фрагментом Ri Т-ДНК (Capone et al., 1989a). При этом только *rolB* из Ri Т-ДНК обладает способностью индуцировать корни на всех протестированных растениях. Инокуляция рекомбинантным штаммом агробактерий, несущим только *rolB*, привела к формированию и росту неопластических корней на дисках моркови (Capone et al., 1989a, 1989b), стеблях табака (Cardarelli et al., 1987b), листьях табака (Spena, Shell, 1987) и листьях каланхоэ (Spena, Shell, 1987). Корни, индуцированные *rolB*, характеризовались плагитропным ростом с формированием большого числа боковых корней *in vitro*, кроме того, все трансформированные корни, в противоположность корням, индуцированным генами *aux* или экзогенным применением ауксина, имели клональное происхождение и не содержали нетрансформированных клеток (Capone et al., 1989b). Позднее, с помощью промотора CAMV 35S, было показано, что гены *rolA* и *rolC* способны вызывать ограниченный рост корней на листьях табака. Трансформация стеблей табака *rolD* не привела к формированию корней (Mauro et al., 1996). Эти результаты совпадают с данными, полученными с использованием транспозонного мутагенеза (White et al., 1985), когда для подавления индукции корней *A. rhizogenes* достаточно только инактивация *rolB*. С другой стороны, инактивация *rolA, rolC, rolD* приводила только к ослаблению индукции корней. Таким образом, каждый из генов *rol* действует на развитие растений по собственному пути и индуцирует неопластический рост растительных клеток или, другими словами, гены *rol* являются растительными онкогенами.

II.B.2. Действие генов *Ri T-ДНК* в трансгенных растениях

Главное отличие «бородатых корней» от «корончатых галлов» – это возможность регенерировать фертильные растения, содержащие полную Т-ДНК. Так как «бородатые корни» имеют клональное происхождение (David, Tempe, 1987; Capone et al., 1989a), растения, полученные из трансформированных корней, являются потомками одной клетки, которая приобрела Т-ДНК. Показано, что *Ri T-ДНК* сохраняется при половом размножении растений и наследуется по менделевской схеме (Constantino et al., 1984; Terfer, 1984). Однако растения, содержащие *Ri T-ДНК*, характеризуются ненормальным развитием и имеют признаки, которые получили название «синдром бородатого корня» (Terfer, 1984): морщинистые листья, измененная длина междоузлий, агравитропный рост корней, измененная морфология цветка и уменьшенная продукция семян.

Для выяснения функции *Ri T-ДНК*, многие открытые рамки считывания (*ORF*) и все *rol*-гены, были клонированы в растительных векторах. Рекомбинантные агробактериальные штаммы, содержащие *Ri ORF* и *rol*-гены, индивидуально и в сочетаниях были использованы для получения трансгенных растений. Как сказано выше, «синдром бородатый корень» изучен у трансгенных растений с индивидуальными и синергетическими эффектами генов *rolA*, *rolB* и *rolC*. Растения, содержащие *rolA*, имели морщинистые листья и уменьшенную длину междоузлий (Sinkar et al., 1988), тогда как растения с геном *rolB* формировали цветки с гетеростилией и имели увеличенное количество адвентивных корней (Cardarelli et al., 1987b; Schmulling et al., 1988). Растения с геном *rolC* характеризовались редуцированным апикальным доминированием, измененной морфологией листа, продукция семян у них снижена (Schmulling et al., 1988). Недавно показано, что у трансгенных растений с геном *rolD* изменен переход от вегетативной фазы развития к генеративной. Растения табака, несущие этот онкоген, формируют цветки быстрее и на более ранней стадии развития (Mauro et al., 1996). Трансгенные растения, несущие *ORF13*, также характеризуются аномалиями развития, такими как мелкие и сильно морщинистые листья, короткий цветок и плохо развитая корневая система (Hansen et al., 1993).

Онкогену *rolB* со строго корнеиндуцирующей способностью уделили особое внимание в надежде на то, что его характеристика поможет понять ключевые молекулярные механизмы дифференцировки корней. При культивировании *in vitro* эксплантов на дифференциальных средах, состоящих из тонких клеточных слоев, было показано, что этот онкоген кроме стимуляции корнеобразования (что ожидалось), значительно усиливает дифференцировку цветков и побегов (Altamura et al., 1994). На эксплантах из трансгенных растений, несущих *rolB*, возникало повышенное количество меристем, которые могли формировать примордии разных органов, в зависимости от состава гормонов в среде. Итак, *rolB* не только способствует дифференцировке корней, но и действует как меристемоиндуцирующий ген. Индукция корней оказалась не единственным результатом воздействия продукта гена *rolB* на дифференцировку растительных клеток. По-видимому, корни являются наиболее часто встречающимися адвентивными органами растений и стимулируются различными эндогенными и экзогенными факторами (Andersen, 1986; Jarvis, 1986).

II.B.3. Функции продуктов *Ri*-генов

Работы по выяснению функций *Ri*-онкогенов основывались на изменениях развития и морфологии трансгенных растений. Основное внимание было уделено генам *rolA*, *B* и *C*, а также *ORF13* и *rolD*. Сходство морфологических аномалий трансгенных растений, содержащих *rolB* (Capone et al., 1989b), с эффектом действия экзогенного ауксина привело к предположению о том, что растительные клетки, экспрессирующие онкоген, обладают измененной активностью ауксина. Простым и элегантным объяснением действия *rolB* явилось то, что его продуктом является β-глюкозидаза. Субстратом для этого фермента являются индоксил-глюкозиды, подобные глюкозидам ИУК (Estruch et al., 1991d). β-глюкозидазная активность указывала на то, что *RolB* может повышать уровень свободного ауксина, освобождая его из неактивных глюकोзид-конъюгатов (Estruch et al., 1991d). Однако, позднее было показано, что ИУК-глюкозиды не являются субстратами для *RolB* и уровень ИУК в *rolB*-трансформированных тканях такой же, как и в нетрансформированных (Nilsson et al., 1993a). Возможно и то, что изменение ауксиновой активности *rolB*-трансформированных клеток могло быть следствием изменения чувствительности к гормонам. Другими словами,

вместо того, чтобы содержать повышенное количество ауксина, *rolB*-клетки могут обладать более высокой чувствительностью к нему. Вторая гипотеза подтверждается тем, что *rolB*-трансформированные клетки действительно более чувствительны к ауксину, чем нормальные.

Типичное быстрое действие ауксина на протопласты сводится к индукции трансмембранного электрического потенциала, требующего концентрации ауксина в 3-5 раз ниже для *rolB*-протопластов по сравнению с обычными клетками (Maurel et al., 1991). Кроме того, повышение чувствительности *rolB*-протопластов к ауксину не является следствием возрастания его уровня (Delbarte et al., 1994). Главной причиной изменения рецепции/трансдукции ауксинового стимула, может быть тирозинфосфатазная активность RolB, выявленная при сверхпродукции этого белка в *Escherichia coli* (Filippini et al., 1996). С точки зрения данных о ключевой роли киназ и фосфатаз в гормональном ответе у животных, подтверждение этой активности у очищенного белка RolB позволило бы пролить свет на путь передачи ауксинового сигнала.

Из других *rol* онкогенов, пожалуй, лучше всего определена биохимическая функция *rolC*. По морфологии растения, трансформированные геном *rolC*, напоминают растения со сверхпродукцией цитокинина. Вероятно, продукт гена *rolC* является цитоплазматическим белком с цитокинин- β -глюкозидазной активностью, способным освобождать цитокинины из N-глюкозидных конъюгатов (Estruch et al., 1991a, 1991b). Последующий анализ трансгенных растений показал редуцированный, а не увеличенный уровень цитокининов, однако повышенным оказался уровень другого гормона - гиббереллина (Nilsson et al., 1993b). Предполагается, что снижение содержания гиббереллина в растениях, экспрессирующих *rolA*, является причиной изменений их фенотипа (Dehio et al., 1993). Наконец, изучение трансгенных растений, несущих *ORF13*, показывает, что этот ген может кодировать новый цитокининподобный фактор (Hansen et al., 1993).

Суммируя результаты работ по изучению Ri онкогенов, можно утверждать, что их действие сходно с эффектом растительных гормонов. Однако биохимические функции онкогенов пока неизвестны и молекулярный механизм развития синдрома «волосатый корень» остается загадкой.

III. Взаимодействие агробактериальных и растительных онкогенов

III.A. РОЛЬ РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА В ОПРЕДЕЛЕНИИ ФЕНОТИПА ОПУХОЛИ

III.A.1. Ответ на ранение

Ответ растений на действие агробактериальных онкогенов определяется не только биохимической активностью их продуктов, но и способностью растения отвечать на их активность. Одним из решающих параметров для формирования фенотипа является способность растения отвечать на ранение. Ранние исследования реакции растений на агробактериальную инфекцию показали, что ранение необходимо для формирования «корончатого галла» (Kahl, 1982). В частности, существует «окно компетентности», необходимое для ответа, и способность к трансформации сохраняется в месте ранения в течение 36-96 часов (Braun, 1982). Сейчас мы знаем, что эта реакция включает продукцию фенольных соединений, подкисление апопласта и синтез полисахаридов, требующихся для экспрессии *vir*-генов Ti и Ri-плазмид. Помимо индукции этих генов, существенными для трансформации являются клеточные деления в сайте ранения и вокруг него. Это заключение основано на данных о том, что время, необходимое для достижения максимальной частоты трансформации, коррелирует с инициацией клеточных делений как в месте ранения целых растений, так и в клеточных культурах *in vitro* (Binns, Thomashow, 1988). По мнению некоторых авторов, интеграция T-ДНК в геном растений может зависеть от стадии клеточного цикла и, особенно, от синтеза ДНК (Braun, 1978).

III.A.2. Комплементация растением мутаций в онкогенах T-ДНК

Ранние исследования опухолеобразования показали, что виды растений различаются по ответу на заражение *A. tumefaciens* (Braun, 1982). Разница в ответе растений и даже различных тканей

одного растения на заражение штаммами *A. tumefaciens* с мутациями в онкогенах доказывает наличие растительных онкогенов. Концепция заключается в том, что у определенных растений (или тканей), инфицированных мутантными штаммами, активируются физиологические процессы, позволяющие преодолеть отсутствие онкогена в Т-ДНК. В результате этого формируются опухоли, которые неотличимы от опухолей, вызванных штаммами дикого типа. Например, штаммы, несущие мутацию в генах *iaaH* и/или *iaaM*, индуцируют типичные для штаммов дикого типа опухоли (не образующие побегов) у *Nicotiana rustica*, *N. debneyi* или *N. glutinosa* (Ooms et al., 1981; Binns et al., 1982). Перенесенные в культуру тканей *in vitro* опухоли *N. glutinosa* обладали ауксиннезависимым ростом и не формировали побегов. Это показывает, что наблюдаемая «комплементация» является следствием не высокого уровня ауксина в растении, а скорее, активации растением собственного синтеза ауксина (Binns et al., 1982). Неожиданным оказалось то, что такой тип комплементации наблюдали при скрещивании разных видов табака (Binns et al., 1982; Binns, 1984) с *N. langsdorfii*, поскольку у гибридов формировались опухоли. Логично предположить, что эта группа *Nicotiana* несет онкоген(ы), которые могут активироваться при работе генов Т-ДНК или существующими в *N. langsdorfii* аналогичными генами. Одна из гипотез, которая может объяснить наблюдаемую комплементацию мутаций по генам *iaaH* и *iaaM*, заключается в том, что при наличии гормонального дисбаланса, то есть в присутствии активного гена *ipt*, генетические системы растения активируются, что и приводит к ауксиннезависимому росту. Эта гипотеза была проверена путем трансформации *N. glutinosa* штаммом, содержащим только гены *ipt* и нопалин-синтазы. В результате на растении формировались опухоли, такие же, как при трансформации штаммами дикого типа, а в культуре *in vitro* они росли независимо от ауксинов и цитокининов (Binns et al., 1987). Интересно, что в культуре нетрансформированных тканей экзогенный цитокинин не вызывал ауксиннезависимый фенотип. Сходные результаты получены и в опытах по трансформации эксплантов листьев *N. tabacum* октопиновым штаммом агробактерии, мутантным по гену *ipt*, но не по генам *iaaH* и *iaaM*: полученные трансформанты были цитокининнезависимыми, хотя исходные листовые экспланты на средах с экзогенным ауксином нуждались в цитокиnine (Black et al., 1994).

Данные о том, что некоторые клетки по-разному отвечают на гормон, который они продуцируют сами или получают извне, имеют большой интерес для понимания развития растений. Хорошо известно, что цитокинины вызывают формирование трахеидоподобных элементов (Fukada, Komamine, 1980). Поскольку цитокинины синтезируются в меристемах, ясно, что формирование трахеидоподобных элементов в ответ на цитокинин наносило бы ущерб функционированию меристем. На сегодняшний день сигнальные системы, заставляющие клетку продуцировать гормон или отвечать на него, неизвестны, хотя ясно, что изменение метаболизма гормонов играет важную роль. Недавно показано (Motyka et al., 1996), что индукция гена *ipt* в трансгенных тканях табака (Gatz et al., 1992) приводит к резкому увеличению как эндогенного содержания цитокининов, так и активности цитокинин-оксидазы – фермента, который отщепляет боковую цепь изопентенила от таких молекул, как изопентениладенозин. Таким образом, продукция эндогенного цитокинина может затрагивать метаболическую активность клеток, но остается неясным, имеются ли различия в ответе клетки, если гормон применяется экзогенно или появляется в результате индукции гена *ipt*.

III.A.3. Клеточные *rol*-гены

Удивительно то, что, по крайней мере, некоторые растения содержат истинные гомологи онкогенов *rol*. С помощью блот-гибридизации по Саузерну (по способности гибридизоваться с ДНК из «волосатых корней», полученных при инокуляции *A. rhizogenes*) показано присутствие последовательностей, гомологичных Ri-плазмиде, в нормальной ткани табака (данные авторов). Последовательности, гомологичные пробе Ri Т-ДНК, были обнаружены в геноме моркови *Daucus carota* (Spano et al., 1982). Позднее последовательности, гомологичные центральному району Т-ДНК, были найдены у *N. glauca* (White et al., 1983) и некоторых других представителей рода *Nicotiana*, включая табак (Furner et al., 1986).

Выявленная сТ-ДНК (cellular T-DNA) гомологична Ri Т-ДНК, в которой находятся гены *rolBC*, и состоит из двойных несовершенных повторов, каждый из которых колинеарен Ri Т-ДНК (Furner et al., 1986). Гомологии нуклеотидной и аминокислотной последовательности генов *Ngrol*

(*N. glauca*) с бактериальными копиями составляет 83% и 75%, а целостность этих открытых рамок считывания доказывает их сохранение и функционирование в геноме *Nicotiana* (Furner et al., 1986). Однако с помощью блот-гибридизации по Нозерну транскрипция сТ-ДНК не была обнаружена. Поэтому сТ-ДНК можно рассматривать как продукт переноса Т-ДНК из *A. rhizogenes*, который в процессе эволюции стал частью генома *Nicotiana* (Furner et al., 1986).

Однако позднее выяснилось (Ichikawa et al., 1990), что гены *NgrolB* и *C* транскрипционно активны в опухолях гибридов *N. glauca* × *N. langsdorfii*. Предложена гипотеза о том, что спонтанное формирование этих генетических опухолей у гибридов может быть связано с тем, что присутствующие в геноме только одного из родителей (*N. glauca*) эндогенные *rol*-гены активируются при попадании в другое генетическое окружение — геном *N. langsdorfii*. Анализ клонированных гомологов *Ri ORF13* и *ORF14* из *N. glauca* расширил наши представления о клеточных онкогенах. Оказалось, что эти гены также «молчат» в растении, но экспрессируются в генетических опухолях. Наконец, выяснилось (Meurer et al., 1995), что эндогенная последовательность, соответствующая гену *rolC*, транскрипционно активна в растениях табака, ее экспрессия тканеспецифична, регулируется цитокинином и подавляется ауксином. Авторы предположили, что ген бактериального происхождения, попавший в предковое растение, в процессе эволюции «приспособился» к выполнению некоторой функции в современном растении.

III.B. РЕГУЛЯЦИЯ АГРОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ОНКОГЕНОВ В РАСТЕНИЯХ

III.B.1. Онкогены Ti-плазмид

Хотя биохимические функции Ti-онкогенов еще до конца не определены, очевидно, что их активность регулируется клетками растения. Это положение было впервые сформулировано авторами (Braun, Wood, 1976), которые описали тератомоформирующие опухоли табака с регенерирующими побегами, возникающими при трансформации штаммом Т37. Поскольку эти тератомы не формировали корней, до взрослого репродуктивного состояния их можно было довести только путем прививки на нормальное растение. Смысл этих опытов заключался в том, что состояние опухолевого роста (неконтролируемая пролиферация) подавлялось формирующимися побегами, но опухолевый рост мог быть активирован при помещении этих тканей в систему *in vitro*. В частности, ткани с ожидаемо высоким эндогенным уровнем ауксина (например, молодые листья) росли спонтанно на безгормональной среде, тогда как ткани с низким уровнем ауксина (например, сердцевина), требовали короткой экспозиции на экзогенном ауксине для формирования опухолей, а затем росли на среде без гормонов. В последующих работах было показано (Black et al., 1986), что ген *iaaH* не работает в дифференцированных тканях, трансформированных штаммом агробактерий Т37, несущим только гены биосинтеза ауксина, но активируется в недифференцированных тканях, возникающих при культивировании тканей *in vitro*. Напротив, гены, контролирующие биосинтез опинов, активируются в растительных клетках независимо от уровня дифференцировки тканей (Wood et al., 1978). Даже в тех случаях, когда гены, кодирующие биосинтез ауксина, активны, уровень конечного продукта мог значительно изменяться при культивировании опухолевых линий (Kuleck et al., 1991). Хотя регуляция транскрипции Ti-плазмидных генов *iaaH* и *iaaM* изучена недостаточно, известно, что гомологичные гены из Ri-плазмиды наиболее активны в делящихся клетках (Gaudin, Jouanin, 1995).

В ряде опытов экспрессия онкогенов Т-ДНК была изучена в трансгенных растениях с использованием конструкции «промотор+репортерный ген». Например, анализ экспрессии конструкции промотор *ipt:GUS* в трансгенных растениях картофеля, показал увеличение в 10–100 раз GUS-активности в стеблях и корнях по сравнению с листьями и клубнями (Dumock et al., 1991). Уровень экспрессии этого химерного гена в листьях, однако, мог быть более высоким, при помещении листьев в культуру *in vitro*, что указывает на то, что промотор *ipt* регулируется факторами среды. Эти же конструкции использовали при трансформации табака, но в этом случае показан более «конститутивный» ответ (Neuteboom et al., 1993). Анализ трансгенных растений табака с промотором гена 5, «сшитым» с маркерным геном *aphII*, показал экспрессию в стебле и череш-

ках, но не в тканях листа, а также зависимость экспрессии гена в протопластах листа от присутствия ауксина и цитокинина (Korber et al., 1991).

При использовании промотора гена *bb* (*bb:GUS*) в трансформированных тканях табака наибольшую экспрессию наблюдали в корнях, низкую в листьях, семядолях, гипокотильях и стеблях (Bagyan et al., 1995). При этом оказалось, что ранение индуцирует экспрессию *bb*, особенно в тканях листа нормального растения, а ауксин стимулирует ее в эксплантах листьев.

Таким образом, активность Ti-плазмидных онкогенов Т-ДНК может регулироваться в растительных клетках с помощью неизвестных молекулярных факторов. В условиях потенциальной токсичности высоких концентраций фитогормонов, регуляция их уровня оказалась приспособленной для пролиферации трансформированных клеток.

III.B.2. Онкогены Ri-плазмид

Среди генов Ri Т-ДНК наиболее полно охарактеризована транскрипционная регуляция *rolB*. Большинство опытов выполнено на трансгенных растениях с экспрессией химерного гена, содержащего делецию 5' некодирующего района *rolB* и репортерный ген *GUS*. В результате показано, что ген *rolB* в процессе развития тонко регулируется за счет сложно организованного собственного промотора, длина которого равна 1200 п.н. На ранних стадиях развития зародыша этот ген неактивен, а затем синхронно активируется во всех клетках в конце стадии глобулы, после чего экспрессируется во всех клетках почти до полного созревания зародыша (Chichiricco et al., 1992). Быстрая и синхронная активация *rolB* происходит тогда, когда клетки зародыша приобретают способность отвечать на ауксин (Lo Schiavo et al., 1991). В зрелых зародышах *rolB* экспрессируется, главным образом, в зоне корня и в меньшей степени в центральном цилиндре. Во взрослых растениях *rolB* экспрессируется тканеспецифично и его продукт локализуется, в основном, в инициальных клетках корня, побега, в цветочных меристемах и в меньшей степени - в паренхиме проводящей системы (Altamura et al., 1991; Capone et al., 1991). Промотор гена *rolB* активируется также ауксином.

Протопласты, свежевыделенные из листьев трансгенных растений, характеризуются низким уровнем экспрессии *rolB*. Однако последующая инкубация с ауксином в течение 24 часов, увеличивает экспрессию *rolB* в 15–20 раз, причем увеличение можно наблюдать уже через 5–6 часов (Maurel et al., 1990; Capone et al., 1991).

В промоторе *rolB* идентифицированы несколько доменов, обозначенных от А до Е. Различные комбинации этих доменов регулируют экспрессию гена в разных популяциях клеток растительной меристемы. Наибольший интерес представляет домен В, делеция которого подавляет не только экспрессию *rolB* во всей меристеме, но и ответ этого гена на ауксин (Capone et al., 1994). Тот факт, что один и тот же регуляторный домен необходим для экспрессии гена в меристемах и ответе на ауксин, а также то, что *rolB* активируется в течение эмбриогенеза в момент, когда клетки зародыша приобретают способность отвечать на ауксин, предполагает связь между гормональным контролем и тканеспецифичностью. Специфичная экспрессия и контроль *rolB* в процессе развития может быть, в конечном счете, следствием различий в концентрации гормона и/или в чувствительности к нему между различными клетками, а также на разных стадиях развития. Следует подчеркнуть, что промотор гена *rolB*, по-видимому, содержит мозаику регуляторных последовательностей и контролируется эндогенными факторами растений. Значит, одни и те же регуляторные белки контролируют экспрессию *rolB* и собственных растительных генов.

Таким образом, «доступ» к генам, которые вовлечены в морфогенез растений, становится возможным благодаря использованию трансгенных растений, содержащих ген *rolB*. Действительно, недавно выявлен растительный регуляторный белок, связывающийся с доменом В. Это белок NtBBF1, который связывается с ДНК посредством единичного домена «цинковые пальцы» нового типа (de Paolis et al., 1996). Интересно, что такой же домен представлен у нового семейства транскрипционных факторов, обнаруженных у филогенетически не родственных растений, таких как кукуруза, табак, арабидопсис и огурец. Транскрипционная регуляция других *rol*-генов изучена в меньшей степени. Гистохимический анализ трансгенных растений, экспрессирующих конструкции *GUS* с 5'-регуляторными районами генов *rolA* (Schmulling et al., 1989b), *rolC* (Schmulling et al., 1989b; Sugaya et al., 1989) и *rolD* (Trovato et al., 1997), показал, что каждый из них регулируется

собственным, характерным только для этого онкогена путем. В частности, экспрессия *rolD* находится под контролем программы развития растения и коррелирует со стадиями удлинения/расширения и созревания тканей. Было бы интересно обнаружить корреляцию между характером экспрессии и функцией онкогенов *rol*, что позволит понять их сложное взаимодействие, нацеленное на контроль роста и дифференцировки клеток.

IV. Заключительные замечания

Онкогены *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes* можно разделить на две группы. Первая группа включает гены, которые вовлечены в биосинтез растительных гормонов. Их экспрессия приводит к повышению уровня эндогенных ауксина или цитокинина, приводя к изменениям ростовых характеристик, характерным для этих гормонов. Вторая, менее изученная группа — это гены, которые вовлечены в метаболизм фитогормонов или в ответ растительных клеток на эти гормоны. Гены *rol* Ri-плазмиды — особенно интригующие представители второй группы, и тот факт, что они в прошлом оказались встроенными в геном, по крайней мере, некоторых растений, делает их еще более необычными. Фенотипы растительных клеток, трансформированных бактериальными онкогенами, зависят не только от их биохимической активности, но также от физиологической и биохимической активности «растительных онкогенов», то есть генов растения-хозяина, которые вовлечены в контроль клеточной пролиферации и/или дифференцировки. В будущем, изучение агробактериальных онкогенов, позволит сосредоточиться на механизмах управления развитием растений, с тем, чтобы добиваться изменения уровня эндогенных гормонов и соответствующего фенотипа, специфически изменяя в тканях или органах растения восприятие гормонального сигнала или ответа на него. Наконец, агробактериальные онкогены (особенно *rol*) будут использованы как инструменты для изучения регуляторных и структурных генов растений, участвующих в морфогенезе и развитии.

V. Литература

- Akiyoshi D.E., Klee H., Amasino R.M., Nester E.W., Gordon M.P. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 81, p. 5994-5998.
- Akiyoshi D.E., Morris R.O., Hinz R., Mischke B.S., Kosuge T., Garfinkel D.J., Gordon M.P., Nester E.W. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 80, p. 407-411.
- Albinger G., Beiderbeck R. (1977) Phytopath. Z. V. 90, p. 306-310.
- Altamura M.M., Archillecti T., Capone I., Costantino P. (1991) New Phytol. V. 118, p. 69-78.
- Altamura M.M., Capitani F., Gazza L., Capone I., Costantino P. (1994) New Phytol. V. 126, p. 283-293.
- Andersen A.S. (1986) In: M.B. Jackson (ed.) New Root Formation in Plants and Cuttings. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, pp. 223-253.
- Bagyan I.L., Revenkova E.V., Posmogova G.E., Kraev A.S., Skryabin K.G. (1995) Plant Mol. Biol. V. 29, p. 1299-1304.
- Barry G.F., Rogers S.G., Fraley R.T., Brand L. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 81, p. 4776-4780.
- Binns A.N. (1983) Planta. V. 158, p. 272-279.
- Binns A.N. (1984) Oxford Surveys of Plant Mol. Cell. Biol. V. 1, p. 133-160.
- Binns A.N. (1994) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. V. 45, p. 173-196.
- Binns A.N., Labriola J., Black R.C. (1987) Planta. V. 171, p. 539-548.
- Binns A.N., Sciaky U., Wood H.N. (1982) Cell. V. 31, p. 605-612.
- Binns A.N., Thomashow M.F. (1988) Ann. Rev. Microbiol. V. 42, p. 575-606.
- Black R.C., Binns A.N., Chang C.F., Lynn D.G. (1994) Plant Physiol. V. 105, p. 989-998.
- Black R.C., Kuleck G.A., Binns A.N. (1986) Plant Physiol. V. 80, p. 145-151.
- Braun A.C. (1951) Cancer Research. V. 11, p. 839-844.
- Braun A.C. (1958) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 44, p. 344-349.
- Braun A.C. (1959) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 45, p. 932-938.
- Braun A.C. (1978) Biochim. Biophys. Acta. V. 516, p. 167-191.
- Braun A.C. (1982) In: G. Kahl, J. Schell (eds.) Molecular Biology of Plant Tumors, Academic Press, New York, p. 155-210.
- Braun A.C., Laskaris (1942) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 28, p. 468-477.
- Braun A.C., Mandle R.J. (1948) Growth. V. 12, p. 255-269.
- Braun A.C., Wood H.N. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 73, p. 496-500.
- Brevet J., Tempe J. (1988) Plasmid. V. 19, p. 75-83.

- Buchmann I., Mamer F.J., Schroder G., Waffenschmidt S., Schroder J. (1985) *EMBO J.* V. 4, p. 853-859.
- Byrne M.C., Koplow J., David C., Tempe J., Chilton M.D. (1983) *J. Mol. Appl. Genet.* V. 2, p. 201-209.
- Capone I., Cardarelli M., Mariotti D., Pomponi M., De Paolis A., Costantino P. (1991) *Plant Mol. Biol.* V. 16, p. 426-443.
- Capone I., Cardarelli M., Trovato M., Costantino P. (1989a) *Mol. Gen. Genet.* V. 216, p. 239-244.
- Capone I., Frugis G., Costantino P., Cardarelli M. (1994) *Plant Mol. Biol.* V. 25, p. 681-691.
- Capone I., Spano L., Cardarelli M., Bellincampi D., Petit A., Costantino P. (1989b) *Plant Mol. Biol.* V. 13, p. 43-52.
- Cardarelli M., Mariotti D., Pomponi M., Spano L., Capone I., Costantino P. (1987b) *Mol. Gen. Genet.* V. 209, p. 475-480.
- Cardarelli M., Spano L., Mariotti D., Mauro M.L., Costantino P. (1987a) *Mol. Gen. Genet.* V. 208, p. 457-463.
- Chichiricci G., Costantino P., Spano L. (1992) *Plant Cell Physiol.* V. 33, p. 827-832.
- Chilton M.D., Drummond M.H., Merlo D.J., Sciaky D., Montoya A.L., Gordon M.P., Nester E.W. (1977) *Cell.* V. 11, p. 263-271.
- Chilton M.D., Tepfer D.A., Petit A., Casse-Delbart F., Tempe J. (1982) *Nature.* V. 295, p. 432-434.
- Costantino P., Mauro M.L., Micheli G., Risuleo G., Hooykaas P.J.J., Schilperoort R.A. (1981) *Plasmid.* V. 5, p. 170-182.
- Costantino P., Spano L., Pomponi M., Benvenuto E., Ancora G. (1984) *J. Mol. Appl. Genet.* V. 2, p. 465-470.
- Crespi M., Messens E., Caplan A.B., Van Montagu M., Desomer J. (1992) *EMBO J.* V. 11, p. 795-804.
- David C., Tempe J. (1987) *Plant Mol. Biol.* V. 9, p. 585-592.
- De Paolis A., Mauro M.L., Pomponi M., Cardarelli M., Spano L., Costantino P. (1985) *Plasmid.* 13, 1-7.
- De Paolis A., Sabatini S., De Pascalis L., Costantino P., Capone L.A. (1996) *Plant J.* V. 10, p. 215-223.
- Dehio C., Grossmann K., Schell J., Schmulling T. (1993) *Plant Mol. Biol.* V. 23, p. 1199-1210.
- Delbarre A., Muller P., Imhoff V., Barbier-Brygoo H., Maurel C., Leblanc N., Perrot-Rechenmann C., Guern J. (1994) *Plant Physiol.* V. 105, p. 563-569.
- Dymock D., Risiott R., de Pater S., Lancaster J., Tillson P., Ooms G. (1991) *Plant Mol. Biol.* V. 17, p. 711-725.
- Estruch J.J., Chiqui D., Grossmann K., Schell J., Spena A. (1991a) *EMBO J.* V. 10, p. 2889-2895.
- Estruch J.J., Parets-Soler A., Schmulling T., Spena A. (1991b) *Plant Mol. Biol.* V. 17, p. 547-550.
- Estruch J.J., Prinsen E., Onckelen H.V., Schell J., Spena A. (1991c) *Science.* V. 254, p. 1364-1367.
- Estruch J.J., Shell J., Spena A. (1991d) *EMBO J.* V. 10, p. 3125-3128.
- Filetici P., Spano L., Costantino P. (1987) *Plant Mol. Biol.* V. 9, p. 19-26.
- Filippini F., Rossi V., Marin O., Trovato M., Downey P.M., Costantino P., Lo Schiavo F., Terzi M. (1996) *Nature.* V. 379, p. 499-500.
- Fukada H., Komamine A. (1980) *Plant Physiol.* V. 65, p. 57-66.
- Fumer I.J., Huffman G.A., Amasino R.M., Garfinkel D.J., Gordon M.P., Nester E.W. (1986) *Nature.* V. 319, p. 422-427.
- Gan S., Amasino R.M. (1995) *Science.* V. 255, p. 1986-1988.
- Garfinkel D.J., Simpson R.B., Ream L.W., White F.F., Gordon M.P., Nester E.W. (1981) *Cell.* V. 27, p. 143-153.
- Gatz C., Froberg C., Wendenburg R. (1992) *Plant J.* V. 2, p. 397-404.
- Gaudin V., Jouanin L. (1995) *Plant Mol. Biol.* V. 28, p. 123-136.
- Goldmann A., Tempe J., Morel G. (1968) *CR Seances Soc. Biol. Ses. Fil.* V. 162, p. 630-631.
- Hamilton R.C., Fall M.Z. (1971) *Experientia.* V. 27, p. 229-230.
- Hansen G., Vaubert D., Heron J.N., Clerot D., Tempe J., Brevet J. (1993) *Plant J.* V. 4, p. 581-585.
- Hendrickson A.A., Baldwin I.L., Riker A.J. (1934) *J. Bacteriol.* V. 28, p. 597-618.
- Hille J., Wullems G.J., Schilperoort R.A. (1983) *Plant. Mol. Biol.* V. 2, p. 155-164.
- Hooykaas P.J.J., Dulk-Ras H., Schilperoort R.A. (1988) *Plant Mol. Biol.* V. 11, p. 791-794.
- Hopkins D.L., Durbin R.D. (1971) *Can. J. Microbiol.* V. 17, p. 1409-1412.
- Huffman G.A., White F.F., Gordon M.P., Nester E.W. (1984) *J. Bacteriol.* V. 157, p. 269-276.
- Ichikawa T., Ozeki Y., Syono K. (1990) *Mol. Gen. Genet.* V. 220, p. 177-180.
- Inze D., Follin A., Van Lijsebettens M., Simoens C., Genetello C., Van Montagu M., Schell J. (1984) *Mol. Gen. Genet.* V. 194, p. 265-274.
- Jarvis B.C. (1986) In: M. B. Jackson (ed.) *New Root Formation in Plants and Cuttings.* Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, p. 191-222.
- Kahl G. (1982) In: J. Schell, G. Kahl (eds.) *Molec. Biol. Plant Tumors.* Acad. Press, NY., p. 211-267.
- Kerr A. (1969) *Nature.* V. 223, p. 1175-1176.
- Klee H.J., Horsch R.B., Hinchee M.A., Hein M.B., Hoffmann N.L. (1987) *Genes and Devel.* V. 1, p. 86-96.
- Korber H., Strizhov N., Staiger D., Feldwisch J., Olsson O., Sandberg G., Palme K., Schell J., Koncz C. (1991) *EMBO J.* V. 10, p. 3983-3991.
- Kuleck G.A., Binns A.N., Black R.C. (1991) *Plant Physiol.* V. 95, p. 1004-1011.
- Leemans J., Deblaere R., Willmitzer L., DeGreve H., Hernalsteens J.P., Van Montagu M., Schell J. (1982) *EMBO J.* V. 1, p. 147-152.
- Lemmers M., De Beuckeleer M., Holsters M., Zambryski P., Depicker A., Hernalsteens J.P., Van Montagu M., Schell J. (1980) *J. Mol. Biol.* V. 144, p. 353-376.
- Li Y., Hagen G., Guilfoyle T.J. (1992) *Devel. Biol.* V. 153, p. 386-395.
- Lichter A., Barash L., Valinsky L., Manulis S. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 4457-4465.
- Lo Schiavo F., Filippini F., Cozzani F., Vallone D., Terzi M. (1991) *Plant Physiol.* V. 97, p. 1303-1308.
- Maurel C., Barbier-Brygoo H., Spena A., Tempe J., Guern J. (1991) *Plant Physiol.* V. 97, p. 212-216.

- Maurel C., Brevet J., Barbier-Brygoo H., Guern J., Tempe J. (1990) *Mol. Gen. Genet.* V. 223, p. 58-64.
- Mauro M.L., Trovato M., De Paolis A., Gallelli A., Costantino P., Altamura M.M. (1996) *Dev. Biol.* V. 180, p. 693-700.
- Medford J.I., Horgan R., El-Sawi Z., Klee H.J. (1989) *Plant Cell.* V. 1, p. 403-413.
- Meyer A.D., Ichikawa T., Meins F. (1995) *Mol. Gen. Genet.* V. 249, p. 265-273.
- Moore L., Guylyn W., Strobel G. (1979) *Plasmid.* V. 2, p. 617-626.
- Motyka V., Faiss M., Strnad M., Kaminek M., Schmulling T. (1996) *Plant Physiol.* V. 112, p. 1035-1043.
- Neuteboom S.T.C., Hulleman E., Schilperoort R.A., Hoge H.C. (1993) *Plant Mol. Biol.* V. 22, p. 933-929.
- Nilsson O., Crozier A., Schmulling T., Sandberg G., Olsson O. (1993a) *Plant J.* V. 3, p. 681-689.
- Nilsson O., Moritz T., Imbault N., Sandberg G., Olsson O. (1993b) *Plant Physiol.* V. 102, p. 363-371.
- Offringa I.A., Melchers L.S., Regensburg-Tuink A.J.G., Costantino P., Schilperoort R., Hooykaas P.J.J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 83, p. 6935-6939.
- Ooms G., Hooykaas P.J.J., Noleman G., Schilperoort R.A. (1981) *Gene.* V. 14, p. 33-50.
- Petit A., Delhaye S., Tempe J., Morel G. (1970) *Physiol. Veg.* V. 8, p. 205-213.
- Ream L.W., Gordon M.P., Nester E.W. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 80, p. 1660-1664.
- Riker A.J. (1926) *J. Agr. Res.* V. 32, p. 83-96.
- Riker A.J. (1930) *J. Agr. Res.* V. 41, p. 438-446.
- Risuleo G., Battistoni P., Costantino P. (1982) *Plasmid.* V. 7, p. 45-51.
- Schmulling T., Beinsberger S., De Greef J., Schell J., Van Onckelen H., Spena A. (1989a) *FEBS Lett.* V. 249, p. 401-406.
- Schmulling T., Schell J., Spena A. (1989b) *Plant Cell.* V. 1, p. 665-670.
- Schmulling T., Schell J., Spena A. (1988) *EMBO J.* V. 7, p. 2621-2629.
- Schroder G., Waffenschmidt S., Weiler E., Schroder J. (1984) *Eur. J. Biochem.* V. 138, p. 387-391.
- Sinkar V.P., Pythoud F., White F.F., Nester E.W. (1988) *Genes and Devel.* V. 2, p. 688-697.
- Skoog F., Miller C.O. (1957) *Symp. Soc. Exp. Biol.* V. 11, p. 118-131.
- Slightom J.L., Durand-Tardif M., Jouanin L., Tepfer D. (1986) *J. Biol. Chem.* V. 261, p. 108-121.
- Smart C.M., Scofield S.R., Bevan M.W., Dyer T.A. (1991) *Plant Cell.* V. 3, p. 647-656.
- Smigocki A.C. (1991) *Plant Mol. Biol.* V. 16, p. 105-115.
- Smigocki A.C., Owens L.D. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 85, p. 5131-5135.
- Smith E.F., Townsend C.O. (1907) *Science.* V. 25, p. 671-673.
- Smith H.H. (1988) *J. Hered.* V. 79, p. 277-283.
- Spanier K., Schell J., Schreier P.M. (1989) *Mol. Gen. Genet.* V. 219, p. 209-216.
- Spano L., Pomponi M., Costantino P., Van Slogteren G.M.S., Tempe J. (1982) *Plant Mol. Biol.* V. 1, p. 291-300.
- Spena A.S., Koncz C., Schell J. (1987) *EMBO J.* V. 6, p. 3891-3899.
- Sugaya S., Hayakawa K., Handa T., Uchimiya H. (1989) *Plant Cell Physiol.* V. 30, p. 649-653.
- Tempe J., Goldmann A. (1982). In: G. Kahl, J. Schell (eds.) *Molec. Biol. Plant Tumors*, Acad. Press, NY, p. 428-450.
- Tepfer D. (1984) *Cell.* V. 37, p. 959-967.
- Tepfer D.A., Tempe J. (1981) *CR Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. III*, p. 153-156.
- Thomashow L.S., Reeves S., Thomashow M.F. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 81, p. 5071-5075.
- Thomashow M.F., Hugly S., Buchholz W.G., Reeves S., Thomashow L.S. (1986) *Science.* V. 231, p. 616-618.
- Thomashow M.F., Nutter R., Montoya A.L., Gordon M.P., Nester E.W. (1980) *Cell.* V. 19, p. 729-739.
- Tinland B., Huss B., Paulus F., Bonnard G., Otten L. (1989) *Mol. Gen. Genet.* V. 219, p. 217-224.
- Trovato M., Mauro M.L., Costantino P., Altamura M. (1987) *Protoplasma*, in press.
- Van Larebeke N., Gentello C., Schell J., Schilperoort R.A., Hermans A.K., Heransteens J.P., Van Montagu M. (1975) *Nature.* V. 255, p. 742-743.
- Van Onckelen H., Prinsen E., Inze D., Rudelsheim P., Van Lijsebettens M., Follin A., Schell J., Van Montagu M., De Greef J. (1986) *FEBS Lett.* V. 198, p. 357-360.
- Van Onckelen H., Rudelsheim P., Inze D., Rudelsheim P., Van Lijsebettens M., Van Montagu M., Schell J. (1984) *Plant and Cell Physiol.* V. 5, p. 1017-1025.
- Wabiko H., Minemura M. (1996) *Plant Physiol.* V. 112, p. 939-951.
- Watson B., Currier T.C., Gordon M.P., Chilton M.D., Nester E.W. (1975) *J. Bacteriol.* V. 123, p. 255-264.
- White F.F., Garfinkel D.J., Huffman G., Gordon M.P., Nester E.W. (1983) *Nature.* V. 301, p. 348-350.
- White F.F., Ghidossi G., Gordon M.P., Nester E.W. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 79, p. 3193-3197.
- White F.F., Nester E.W. (1980) *J. Bacteriol.* V. 141, p. 1134-1141.
- White F.F., Taylor B.H., Huffman G.A., Gordon M.P., Nester E.W. (1985) *J. Bacteriol.* V. 164, p. 33-44.
- White P., Braun A.C. (1942) *Cancer Res.* V. 2, p. 597-617.
- Willmitzer L., Dhaese P., Schreider P.H., Schmalenbach W., Van Montagu M., Schell J. (1983) *Cell.* V. 32, p. 1045-1056.
- Willmitzer L., Sanchez-Serrano J., Buschfeld E., Schell J. (1982a) *Mol. Gen. Genet.* V. 186, p. 16-22.
- Willmitzer L., Simons G., Schell J. (1982b) *EMBO J.* V. 1, p. 139-146.
- Wood H.N., Binns A.N., Braun A.C. (1978) *Differentiation.* V. 11, p. 175-180.
- Yamada T., Palm C.J., Brooks B., Kosuge T. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 82, p. 6522-6526.
- Zaenen L., Van Larebeke N., Teuchy H., Van Montagu M., Schell J. (1974) *J. Mol. Biol.* V. 86, p. 109-127.

Организация и регуляция генов вирулентности *Agrobacterium*

Джонсон Т.М., Дас А.

I.	Введение.....	291
II.	Факторы, необходимые для переноса ДНК.....	291
III.	Регуляция <i>vir</i> -генов.....	293
	III.A. Цис-действующие последовательности.....	294
	III.A.1. Локализация.....	295
	III.B. Транс-действующие факторы.....	296
	III.B.1. Сигналы из окружающей среды.....	296
	III.B.2. Белковые факторы.....	297
IV.	Заключение.....	301
V.	Благодарности.....	301
VI.	Литература.....	301

I. Введение

Грам-отрицательные почвенные бактерии *Agrobacterium tumefaciens* вызывают болезнь — неопластические опухоли (корончатые галлы), возникающую в результате инфекции в месте поранения у большинства видов двудольных растений (Smith, Townsend, 1907). Опухолеобразование происходит в результате переноса и стабильной интеграции фрагмента бактериальной ДНК в растительный геном. Переносимая (transferred) (Т-)ДНК является частью крупной Тi (опухоль-индуцирующей — tumor inducing) плазмиды и кодирует в числе других гены, контролирующие биосинтез растительных гормонов, ауксинов и цитокининов. Конститутивная экспрессия этих генов в трансформированных растениях приводит к неконтролируемому росту клеток — опухолевому фенотипу (Hooykaas, Beijersbergen, 1994; Zupan, Zambryski, 1995; Das, 1997). Родственная бактерия *A. rhizogenes* переносит в растение ДНК из Ri (корне-индуцирующей — root inducing) плазмиды (Moore et al., 1979; White, Nester, 1980).

Характерной особенностью корончатых галлов является гормон-независимый рост в культуре и способность синтезировать низкомолекулярные соединения, известные как опины (Braun, 1958; Menage, Morel, 1964; Guyon et al., 1980; Petit, Tempe, 1985). Гены биосинтеза опинов локализованы в Т-ДНК, а гены их катаболизма — в другом районе Тi-плазмиды. Опины могут быть использованы как источник углерода, азота и энергии для роста бактерии. Различные штаммы агробактерий синтезируют разные опины: октопин, нопалин, лейцинопин, сукцинамопин, названия которых используют в обозначении штаммов.

II. Факторы, необходимые для переноса ДНК

Т-ДНК не содержит генов, необходимых для ее собственного переноса. Единственный необходимый элемент Т-ДНК — это цис-действующий участок, 24-нуклеотидные прямые повторы, известные как пограничные последовательности (Yadav et al., 1982; Zambryski et al., 1982; Halsters et al., 1983). Эти последовательности находятся на обоих концах переносимой Т-ДНК. Делеция правой пограничной последовательности нопалиновой Тi-плазмиды приводит к авирулентности

штамма; вирулентность может быть восстановлена синтетической 24-нуклеотидной последовательностью ДНК (Wang et al., 1984; Peralta, Ream, 1985). Октопиновая Ti-плазмида содержит еще одну консервативную последовательность - "overdrive", которая необходима для эффективного переноса ДНК. Она имеет размер 24 п.н., расположена справа от пограничной последовательности и функционирует как энхансер, стимулируя перенос ДНК в любой ориентации и на различном расстоянии от пограничной последовательности (Peralta et al., 1986; van Haaren et al., 1987). Выяснение возможности транспорта в растительные клетки фрагментов ДНК, находящихся в cis-положении относительно пограничных последовательностей, путем опосредованного агробактерией переноса произвело революцию в генетическом манипулировании у растений.

Гены, необходимые для переноса ДНК, закодированы в *vir*-области Ti-плазмиды (Garfinkel, Nester, 1980; Ooms et al., 1987). *Vir*-область октопиновой Ti-плазмиды pTiA6 составляет 44 т.п.н. и состоит из шести групп комплементации, *virA-virH* (Stachel, Nester, 1986; Kanemoto et al., 1989; Melchers et al., 1990). Мутации в генах *virA*, *virB*, *virD* и *virG* приводят к авирулентности, в то время как мутации в других *vir*-генах - к ослаблению вирулентности или к ограничению спектра хозяев (Stachel, Nester, 1986). В *vir*-области нопалиновой Ti-плазмиды отсутствуют гены *virF* и *virH*, но имеется другой ген - *tzs* (рис. 1).

К настоящему моменту определена последовательность ДНК *vir*-генов октопиновой Ti-плазмиды pTiA6 и нопалиновой Ti-плазмиды pTiC58. Эта область может кодировать 22-27 белков, 17 из которых необходимы для вирулентности. Два белка VirA и VirG - регуляторные: они контролируют экспрессию всех *vir*-генов (Stachel, Zambryski, 1986). VirA и VirG гомологичны белкам бактериальных двухкомпонентных регуляторных систем (Winans et al., 1986; Melchers et al., 1986; Leroux et al., 1987).

Оперон *virB* содержит 11 открытых рамок считывания (Thompson et al., 1988; Ward et al., 1988; Kulda et al., 1990; Rogovsky et al., 1990). Анализ первичной структуры белков показывает, что, по крайней мере, 9 из них - мембранные, поскольку содержат один или более мембрансвязывающих доменов, сигнальную последовательность, которая транспортирует белок в периплазму, или то и другое. Биохимические опыты показали, что все 11 белков действительно связаны с бактериальными мембранами (Ward et al., 1990; Thorenso et al., 1993; Berger, Christie, 1993; Shirasu, Kado, 1993). Поскольку оперон *virB* не требуется для формирования Т-нити ДНК и кодирует белки, являющиеся мембранными или связанными с мембраной, предполагается, что белки VirB принимают участие в формировании поры, через которую Т-ДНК выходит из бактерии. Помимо VirB, для переноса ДНК необходим белок VirD4 (Beijersbergen, Hooykaas, 1992; Yoshioka et al., 1994).

Оперон *virD* может кодировать 5 белков (Jajaswal et al., 1987). Три из них (VirD1, VirD2, VirD4) необходимы для переноса ДНК (Stachel, Nester, 1986; Vogel, Das, 1992; Koulikova-Nikola et al., 1993). VirD1 и VirD2 вместе катализируют надрезание Т-ДНК в пограничных областях, инициируя процессинг Т-ДНК, необходимый для ее переноса в растительную клетку (Yanofsky et al., 1986; Jayaswal et al., 1987). VirD1 содержит элемент "спираль-поворот-спираль", который

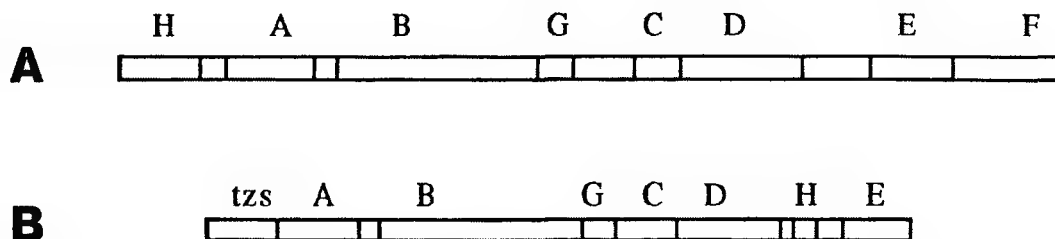


Рисунок 1. Физическая карта области вирулентности октопиновой (А) и нопалиновой (В) Ti-плазмид. Все гены транскрибируются слева направо, кроме гена *virC* из октопиновой и генов *virC*, *virH*, *tzs* из нопалиновой Ti-плазмид.

картируется в пределах функционального домена (Porter et al., 1987; Vogel, Das, 1994). Хотя оба белка должны связываться с пограничной последовательностью для того, чтобы произошло надрезание ДНК, *in vitro* связывания с этой последовательностью обнаружено не было. VirD4, интегральный мембранный белок необходим для переноса Т-ДНК из бактерий в растительную клетку (Okamoto et al., 1991; Yoshioka et al., 1994).

Оперон *virC* кодирует два белка. Мутации в *virC* влияют на спектр хозяев штамма (Yanofsky et al., 1985). Мутанты *virC* имеют ослабленную вирулентность при поражении *Kalanchoe daigremontiana*, но полностью вирулентны для *Nicotiana glauca*. Оперон *virE* кодирует два белка, VirE1 и VirE2 (Winans et al., 1987). VirE1 — это полипептид размером 7 кД, необходимый для переноса ДНК (McBride, Knauf, 1988). Он требуется для транспорта VirE2 в растительные клетки (Sundberg et al., 1996). Более крупный белок, VirE2, связывается с одонитевой ДНК независимо от ее последовательности (Citovsky et al., 1989; Sen et al., 1989). Предполагается, что VirE2 предохраняет Т-нить ДНК от клеточных нуклеаз (Das, 1988).

Октопиновая Т1-плаزمиды содержит два дополнительных локуса: *virF* и *virH*. Мутанты по локусу *virF* имеют ослабленную вирулентность. Отсутствие *virF* в нопалиновых штаммах делает их неспособными эффективно индуцировать опухоли на *N. glauca* (Melchers et al., 1990). Ген *virF* кодирует белок, сходный с VirE2 (см. следующий раздел). Мутации в локусе *virH* (*pinF*) не влияют на опухолеобразование (Stachel, Nester, 1986). Он был исходно обнаружен как locus, индуцируемый растением. Впоследствии было показано, что *virH* требуется для опухолеобразования только когда для инфекции использованы небольшие количества бактерий (Stachel, Nester, 1986; Kanemoto et al., 1989). Этот locus содержит 4 открытых рамки считывания (ORF), две из которых гомологичны ферментам цитохрома Р-450. Роль первой и четвертой ORF в процессе опухолеобразования неясна из-за отсутствия мутаций в этих ORF. Мутации в ORF2 и ORF3 приводят к снижению вирулентности, что показывает их функциональную важность.

Интересной особенностью *virE* и *virF* является то, что мутации по этим генам могут комплементировать штаммы без Т-ДНК при коинокуляции места поранения двумя штаммами агробактерий (Otten et al., 1984, 1985). Для того, чтобы это произошло, в комплементирующих штаммах должны присутствовать все необходимые *vir*-гены и хромосомные гены вирулентности (Otten et al., 1984; Christie et al., 1989). Предполагается, что *virE* и *virF* кодируют продукты, которые могут диффундировать от одной бактерии к другой в месте поранения (Otten et al., 1985). Опыты с трансгенными растениями, которые экспрессируют VirE2 и VirF, показали, что они чувствительны к инфекции соответствующими *vir*-мутантами, то есть данные белки функционируют в растительной клетке (Citovsky et al., 1992; Regensburg-Tuink, Hooykaas, 1993). Очевидно, что пора, через которую переносится Т-ДНК, может обеспечивать передачу Vir-белков в растительную клетку, и внеклеточная комплементация включает транспорт VirE2/VirF и Т-ДНК из двух штаммов (Regensburg-Tuink, Hooykaas, 1993; Binns et al., 1995; Sundberg et al., 1996).

III. Регуляция *vir*-генов

Нашими знаниями об области вирулентности мы обязаны использованию транспозона Tn3::lacZ, с использованием которого были определены границы отдельных локусов и направления транскрипции, описан locus *virG* и охарактеризована регуляция экспрессии *vir*-генов (Stachel, Nester, 1986). В условиях вегетативного роста бактерий экспрессируются только *virG* и *virA* (Stachel, Zambryski, 1986). Экспрессия всех *vir*-генов, включая *virG* и *virA*, индуцируется, когда бактериальные и растительные клетки смешаны вместе (Stachel, Zambryski, 1986; Winans et al., 1988). Небольшие молекулы, присутствующие в среде культивирования растительных клеток, функционируют как индукторы экспрессии *vir*-генов (Stachel et al., 1986). Два индуктора, 3',5'-диметокси-4'-гидрокси-ацетофенон (широко известный, как ацетосирингон) и α -гидрокси-ацетосирингон, были впервые выделены из культуры клеток табака (Stachel et al., 1985). Конститутивные гены *virA* и *virG*, обеспечивающие транскрипционную активацию *vir*-генов, взаимодействуют с этими индукторами (Stachel et al., 1986; рис. 3). Для индукции *vir*-генов необходима кислая среда (pH=5.3-6.0) и низкая ($\leq 30^\circ\text{C}$) температура.

Транскрипция *virG* контролируется другими факторами: кислая среда, дефицит фосфата и другие стрессовые стимулы, не связанные с генами *virA-virG* (Winans, 1990; Aoyama et al., 1991; Mantis, Winans, 1992). Предполагается, что уровень белка VirG лимитирован в вегетативно растущих бактериях: способность промотора реагировать на внешние стимулы приводит к увеличению количества белка, который начинает регулировать собственный синтез, а также экспрессию других *vir*-генов в ответ на сигнальные молекулы растения.

Гены *virC* и *virD* являются, кроме того, объектами негативной регуляции, имея сходные регуляторные области. Хромосомный ген *ros* действует как репрессор, сохраняя данные гены в выключенном состоянии при вегетативном росте бактерий (Close et al., 1985, 1987). Ген *ros* не требуется для опухолеобразования, а его продукт — белок с массой 15,5 кД, связывается с инвертированными повторами, расположенными перед промоторами *virCD* (Cooley et al., 1991).

III.A. ЦИС-ДЕЙСТВУЮЩИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Существование регуляторного механизма, который контролирует экспрессию всех *vir*-генов, наводит на мысль о наличии консервативного элемента, который функционирует как сигнал для транскрипционной активации. Анализ промоторных областей *vir*-генов pTiA6 привел к обнаружению двух гексамеров, присутствующих в большинстве из них (Das et al., 1986). Один из этих гексамеров, dGCAATT является фрагментом более крупного 12-ти-нуклеотидного элемента, dTNCAATTGAAAPy, который присутствует в одной или более копиях во всех *vir*-генах (Winans et al., 1987). Сходные последовательности найдены и перед *vir*-генами нопалиновой Ti-плазмиды (Close et al., 1988). Консервативные последовательности были названы “*vir*-боксами”, которые считают цис-действующими элементами, необходимыми для экспрессии *vir*-генов. *Vir*-гены Ri-плазмид содержат один или более блоков из шестичленных последовательностей, dTG(A/T)AAPy, сходных с 3'-концом *vir*-бокса *vir*-генов плазмид pTiA6 и pTiC58 (Aoyama et al., 1989). Предполагается, что эта последовательность играет роль при регуляции экспрессии *vir*-генов Ri-плазмиды.

Анализ промоторной области гена *virB* из pTiA6 привел к идентификации последовательности, необходимой для экспрессии (Das, Pazour, 1989). Обнаружено, что 68 нуклеотидов до точки начала транскрипции необходимы для индуцируемой растением экспрессии *virB*. В пределах этой области находятся два *vir*-бокса, разделенные 11 нуклеотидами. Делеция дистального *vir*-бокса приводит к полному отсутствию экспрессии *virB*. Инсерция или делеция в пределах спейсера также негативно сказывается на экспрессии гена *virB*, что показывает важность взаимного расположения двух *vir*-бокса и/или то, что промотор и дистальный *vir*-бокс важны для экспрессии *virB*. Дальнейший анализ этих последовательностей показал, что *vir*-бокс представляет собой тетрадекамерную последовательность с консенсусом dPuPyTDCAATTGHAAPy (D=A,G или T; H=A,C или T) (Pazour, Das, 1990a). Центральные шесть остатков, dCAATTG — наиболее консервативны. Мутация TT-остатков в CC приводит к 80%-процентному снижению экспрессии *virB* (Das, Pazour, 1989). *Vir*-бокс является палиндромом, и присутствия только правой его половины не достаточно для экспрессии *virB*. Правая половина *vir*-бокса генов *virB* из pTiA6 (dTGGAAAT) гомологична *vir*-боксу pRi. Таким образом, половина последовательности, найденная в *vir*-генах pRiA4, не достаточна для экспрессии *virB* pTiA6.

Число *vir*-бокса у различных *vir*-генов сильно варьирует (Winans et al., 1987; Steck et al., 1988; Das, Pazour, 1989). Гены *virA* и *virE* из pTiA6 содержат один *vir*-бокс, а *virB*, *virC*, *virD* и *virG* содержат 2-5 *vir*-бокса. Корреляции между количеством *vir*-бокса и степенью индукции гена не обнаружено. Высоко индуцибельный ген *virE* имеет 1 *vir*-бокс, в то время как слабо индуцибельный *virG* имеет 2 *vir*-бокса (Pazour, Das, 1990; Winans, 1990). Более детальный анализ показал, что из 5 общих *vir*-бокса, которые присутствуют у гена *virD*, только 1 необходим для экспрессии (Pazour, Das, 1990). Для экспрессии *virC* или *virB* один *vir*-бокс является необходимым, а второй требуется для повышения уровня экспрессии. Консервативность *vir*-бокса и их роль в экспрессии *vir*-генов предполагает, что эти последовательности работают как сайты узнавания для регуляторного белка VirG.

Таблица 2. Потребность *vir*-генов pTi в *vir*-боксах (Das, Pazour, 1989; Pazour, Das, 1990). pRi *vir*-боксы взяты из табл. 1

Положения последовательностей <i>vir</i> -боксов <i>vir</i> -генов pTi и pRi			
Ген	Центр <i>vir</i> -бокса в позиции		
		Ti	Ri
<i>virA</i>	Последовательность <i>vir</i> -боксов <i>vir</i> -генов Ri-плазмид		
			-76,5
<i>virB</i>	Бокс 1	-61,5	-62,5
	Бокс 2	-42,5	-
<i>virC</i>	Бокс C2D4	-53,5	-52,5
	Бокс C4D2	-42,5	-
<i>virD</i>		-75,5	-72,5
<i>virE</i>		-61,5	-52,5
<i>virG</i>	Бокс 1	-57,5	-62,5
	Бокс 3	-24,5	-

III.B. ТРАНС-ДЕЙСТВУЮЩИЕ ФАКТОРЫ

III.B.1. Сигналы из окружающей среды

Экспрессия генов вирулентности зависит от среды, в которой культивируются растительные клетки (Stachel et al., 1985). Естественные метаболиты растительных клеток функционируют как индукторы *vir*-генов, первыми из которых были обнаружены ацетосирингон и α -гидрокси-ацетосирингон из культуры клеток табака (Stachel et al., 1985). Анализ нескольких производных ацетосирингона показал функциональную важность фенольной гидроксогруппы в положении 4 и двух метокси-групп в положениях 3 и 5 (рис. 2).

Комплексное изучение структуры *vir*-индуцирующих соединений показало (Melchers et al., 1989b), что основной единицей является орто-метоксифенол. Вторая метокси-группа в положении R5 заметно увеличивает эффективность индуктора. Положение R1 может быть занято разными группами, включая -H, -CHO, -COOH, -COCH₃ и -CH=CH-CO₂H. -C=C- в положении R1 увеличивает эффективность индукции. Незамещенный фенол может индуцировать экспрессию *vir*-генов у штамма *Agrobacterium* дикого типа - KU12, выделенного в Корее, то есть фенол играет важную роль в индукции (Lee et al., 1995). Некоторые природные фенольные производные, а именно метилсирингат из винограда, дегидроконицерил табака, этилферулат пшеницы и флавоноиды петунии были определены как индукторы *vir*-генов (Usami et al., 1988; Zerback et al., 1989; Spencer et al., 1990; Messens et al., 1990). Фенил-пропаноид-глюкозид из ели Дугласа - кониферин, определен как сильный индуктор *vir*-генов (Moms, Morris, 1990). Это единственный известный индуктор, в котором отсутствует свободная OH-группа. Однако штаммы *Agrobacterium*, имеющие высокую β -глюкозидазную активность, более активно индуцируют опухоли на ели Дугласа. Предполагается, что клеточные глюкозидазы превращают кониферин в конифериловый спирт, являющийся истинным индуктором *vir*-генов.

Присутствие определенных сахаров сильно увеличивает чувствительность *Agrobacterium* к фенольным индукторам (Cangelosi et al., 1990; Shimoda et al., 1990). Альдозы (L-арабиноза, D-ксилоза, D-ликтоза, D-глюкоза, D-манноза, D-идоза, D-галактоза, D-фукоза) и неметаболизируемые сахара (2-деокси-D-глюкоза и 6-деокси-D-глюкоза), большинство из которых имеет оди-

наковую С-3 стереохимическую структуру, действуют как усилители экспрессии ацетосирингон-индуцибельных *vir*-генов. Мишенью для действия сахаров является белок ChvE, кодируемый хромосомным геном (Cangelosi et al., 1990). Этот белок связывается с глюкозой и затем взаимодействует с сенсором VirA.

Другими факторами среды, влияющими на экспрессию *vir*-генов, являются pH и температура. Для индукции необходимы низкие значения pH=5.3-6.0 (Stachel et al., 1985). Кроме того, индукция чувствительна к температуре (оптимум 28-30°C). На все факторы окружающей среды реагирует сенсорный белок VirA, который воспринимает фенольные индукторы, он в большой степени ответствен за определение кислотности и неактивен при высоких температурах (Melchers et al., 1989a; Turk et al., 1991; Jin et al., 1993a).

III.B.2. Белковые факторы

VirA. Продукты гена *virA* Ti- и Ri- плазмид состоят из 829-833 аминокислотных остатков. VirA содержит два гидрофобных района (у pTiA6 в положениях 18-39 и 260-278), которые функционируют как трансмембранные домены (Melchers et al., 1989). Большая часть белка (от 279-го остатка и до конца) находится в цитоплазме. Цитоплазматическая область состоит из двух консервативных доменов: киназного и воспринимающего сигнал. Киназный домен (остатки 419-691 у белка, кодируемого pTiA6) относится к семейству сенсоров (Leroux et al., 1987; Melchers et al., 1987). Воспринимающий домен гомологичен N-терминальному домену VirG и найден только в группе сенсорных белков (Stock et al., 1989).

Химеры VirA были использованы для функционального анализа N-концевых доменов VirA (Melchers et al., 1989a; Turk et al., 1994). Только первый трансмембранный домен может быть заменен сходным доменом Tag-рецептора *E. coli*, что говорит о том, что первый домен важен для топологии белка (Melchers et al., 1989a). Картирование конститутивного мутанта по этому домену показало, что он играет существенную роль в функционировании VirA (Pazour et al., 1991). Периплазматический домен не функционирует при распознавании, поскольку делеция большей части домена (остатки 63-240 белка VirA, кодируемого плазмидой pTiA6) не влияет на индукцию *vir*-генов. Делеционный мутант, однако, не чувствителен к сахарам, что говорит о необходимости периплазматического домена для индукции *vir*-генов сахарами. Считается, что этот домен взаимодействует с сахаросвязывающим белком ChvE. Мутационный анализ показал, что единичные аминокислотные замены и короткие делеции в пределах периплазматического домена приводят к неспособности VirA реагировать на сахара. Три одиночных мутанта, *virAE210V*, *virAG211D* и *virAE255L*, и двойной мутант, *virAT44ST45R*, не реагируют на сахара и характеризуются конститутивным увеличением экспрессии *vir*-генов (Machida et al., 1993; Turk et al., 1993; Banta et al., 1994). Отсутствие реакции на сахара наблюдали, если любой из трансмембранных доменов был заменен на сходный домен Tag белка *E. coli* (Turk et al., 1994). Последующие наблюдения подтвердили вывод о том, что оба трансмембранных домена играют важную роль в функционировании белка VirA (Pazour et al., 1991). Мутационный анализ показал, что N-терминальный участок цитоплазматического домена важен для индуцируемой ацетосирингоном экспрессии *vir*-генов (Chang, Winans, 1992). Хотя прямых доказательств такой индукции пока нет, некоторые опыты косвенно подтверждают этот вывод (Turk et al., 1994; Doty et al., 1996).

Важный вопрос, на который пока нет ответа - как ацетосирингон взаимодействует с VirA? Неспособность к непосредственному связыванию ингибитора экспрессии *vir*-генов α -бромо-5-иодоацетованилона с VirA, и его способность специфически связываться с хромосомными белками p10 и p21, привели к заключению о том, что другие белки являются посредниками в передаче сигнала от индуктора к белку VirA (Lee et al., 1992). Генетические опыты показали, что сенсором индуктора является VirA (Lee et al., 1995). Путем переноса Ti-плазмид было показано, что именно *virA*, а не гены бактериальной хромосомы, определяют индукцию *vir*-генов.

Центральный сегмент цитоплазматического домена кодирует киназный домен, консервативный во всех сенсорных белках (Stock et al., 1989; Parkinson, Kofoed, 1992). Эта область белка VirA, кодируемого плазмидой pTiA6, содержит консервативный гистидин, His474, являющийся сайтом фосфорилирования. В ответ на появление индуктора VirA автофосфорилируется по гистидиновому-

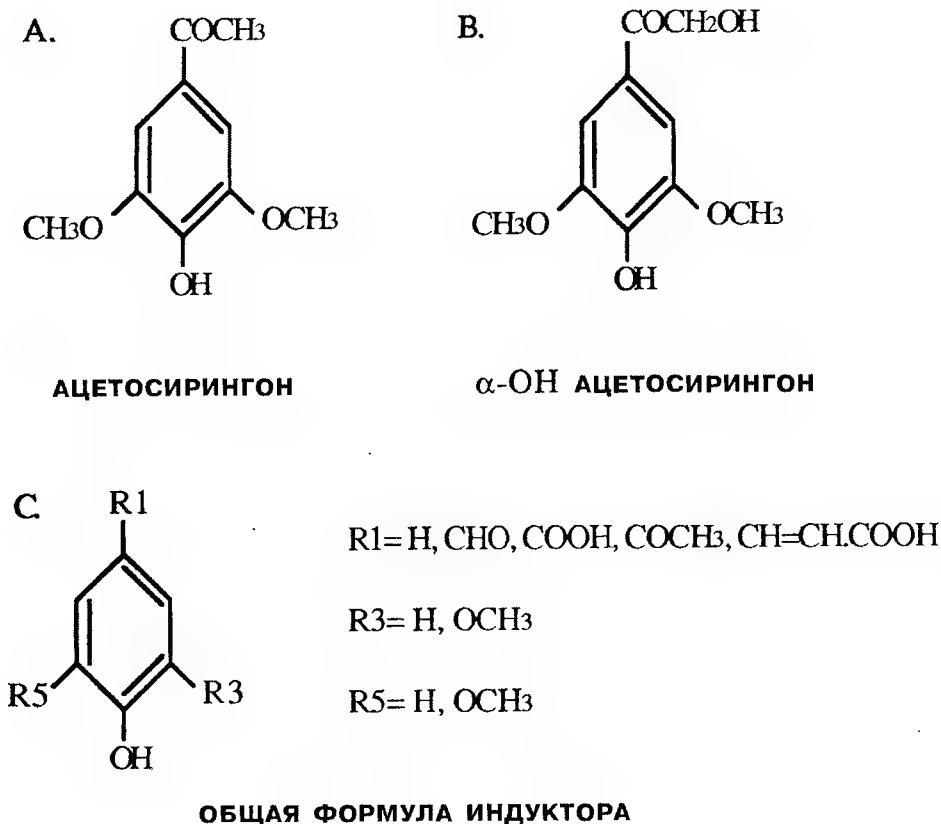


Рисунок 2. Индукторы *vir*-генов агробактерий. Табак образует ацетосирингон и α-гидроксид-ацетосирингон.

му остатку и переносит фосфат на аспарат в положении 52 белка VirG. *In vitro* показано независимое от индуктора автофосфорилирование у производного VirA, содержащего только цитоплазматический домен (Jin et al., 1990b; Huang et al., 1990). Картирование трех ацетосирингон-независимых мутаций вблизи гистидина 474 показывает, что локальная структура этой области играет важную роль в экспрессии *vir*-генов (Ankenbauer et al., 1991; Pazour et al., 1991). Две другие конститутивные мутации картированы в С-терминальной области белка (Pazour et al., 1991; McLean et al., 1994). Эти мутации лежат в пределах или вблизи глицин-богатой последовательности, функцией которой считается связывание с нуклеотидами (Pazour et al., 1991). Кодоминантные фенотипы нескольких конститутивных мутантов говорят о том, что VirA функционирует как олигомер (Pazour et al., 1991). В подтверждение этой гипотезы показано, что VirA существует как димер и что индуктор не влияет на его формирование (Pan et al., 1993).

Необычной особенностью структуры VirA является наличие у его С-конца домена, гомологичного N-концевому домену части молекулы, воспринимающей сигнал (Stock et al., 1989). Сходная особенность обнаружена у ряда сенсорных белков: ArcB *E. coli*, RcsE *E. coli*, BvgS *B. pertussis*, RteA *B. thaitaomicron*, LemA *P. syringae*, RffC *X. campestris* и ApgA *M. xanthus* (Parkinson, Kofoed, 1992). Картирование конститутивных мутаций в сенсорном домене и его структурное сходство с эукариотическими протеинкиназами показали, что этот домен сходен с автоингибиторным доменом протеинкиназ и является негативным регулятором VirA (Soderling, 1990; Pazour et al., 1991).

Делеция этого домена делает VirA конститутивным индуктором транскрипции (Chang, Winans, 1992; Gubba et al., 1995), а сверхпродукция *in trans* восстанавливает низкий базальный уровень активности VirA у С-концевого делеционного мутанта (Chang et al., 1996). Показано также, что удаление этого домена приводит к тому, что нестимулирующие фенольные соединения, такие как 4-гидроксиацетофенон, начинают стимулировать экспрессию *vir*-генов. Следовательно, другой функцией сенсорного домена является ограничение спектра фенолов, которые могут активировать *vir*-гены.

VirG. Второй регуляторный белок, VirG - это активатор, который позитивно регулирует все *vir*-гены. Анализ последовательности и генетические опыты показали, что белки VirG, кодируемые Ti-и Ri-плазмидами, состоят из 241 аминокислотных остатков и имеют 85-94% сходства друг с другом (Winans et al., 1986; Melchers et al., 1986; Powell et al., 1987; Aoyama et al., 1989; Pazour, Das, 1990b). VirG состоит из двух доменов: N-концевой, воспринимающий сигнал и С-концевой output-домен. В ответ на растительные фенольные соединения VirA фосфорилируется и переносит фосфат на аспартат N-терминального домена VirG. Опыты *in vitro* показали (Jin et al., 1990a), что VirA фосфорилирует аспарагиновую кислоту в положении 52. Замена аспарагиновой кислоты 52 на нефосфорилируемый гомолог - аспарагин или глутаминовую кислоту приводит к функциональной неактивности VirG (Roitsch et al., 1990; Pazour et al., 1992). Кроме аспартата 52, два других аспартата в положениях 8 и 9, а также лизин в положении 102 консервативны у регуляторных белков семейства VirG (Stock et al., 1989). Сайт-специфический мутагенез показал, что остатки аспарагиновой кислоты в положениях 8 и 98 существенны для функционирования VirG (Roitsch et al., 1990). С-концевой (output) домен белка VirG имеет ДНК-связывающую функцию (Powell, Kado, 1990). Он гомологичен доменам белков OmpR, PhoB и SfrA *E. coli* (Winans et al., 1986; Melchers et al., 1986). Анализ белковых сшивок, сравнение первичных последовательностей различных ДНК-связывающих белков и характеристика мутантов VirG показали, что остатки 160-210 образуют основную часть ДНК-связывающего домена (Powell, Kado, 1990; Suzuki, 1993). Необходимость *vir*-бокса для экспрессии *vir*-генов и его присутствие в нетранскрибируемых районах индуцибельных генов показывает, что *vir*-бокс является мишенью для связывания VirG. С использованием белков из сверхпродуцирующих штаммов *E. coli* показано специфическое связывание VirG с последовательностями *vir*-боксов из плазмид pTiA6 и pRiA4 (Jin et al., 1990c; Pazour, Das, 1990b; Tamamoto et al., 1990). В случае промоторов *virCD* и *virG*, содержащих множественные *vir*-боксы, VirG специфически связывается только с теми из них, которые необходимы для экспрессии данных генов *in vivo* (Pazour, Das, 1990a, 1990b). Для изучения функциональных доменов был широко использован мутагенез *virG*. Идентифицированы 3 мутанта, у которых наблюдается независимая от индуктора экспрессия *vir*-генов (Pazour et al., 1992; Han et al., 1992; Jin et al., 1993b; Scheeren-Groot et al., 1994; Gubba et al., 1995). Эти мутации картируются в воспринимающем сигнал домене и определяют замену аспарагина 54 на аспарагиновую кислоту (*virGN54D*), изолейцин 77 на валин (*virGI77V*) и изолейцин 106 на лейцин (*virGI106L*). Один из них (*virGN54D*) не воспринимает *virA* и ацетосирингон, два других активируются VirA (Pazour et al., 1992; Gubba et al., 1995). Два мутанта (*virGN54D* и *virGI106L*) не функционируют без аспарагиновой кислоты 52. Третий мутант (*virGI77V*) функционирует без аспарагиновой кислоты 52; он был изолирован как мутант, восстанавливающий активность нефункционального мутанта *virGDS2E* (Gubba et al., 1995). Этот мутант сверхчувствителен к ацетосирингону, то есть индуцируется при низкой концентрации (Scheeren-Groot et al., 1994). Были выделены еще два мутанта со сходным сверхчувствительным фенотипом - *virGMI3T* и *virGHI5R* (Han et al., 1992). Все эти конститутивные мутации картированы в воспринимающем сигнал домене. Отсутствие таких мутаций в С-концевом домене говорит о том, что отдельная аминокислотная замена в output-домене не достаточна для того, чтобы повлиять на активацию VirG, которая должна включать конформационные изменения в С-концевом домене.

Многие мутанты, дефектные по индукции *vir*-генов, были идентифицированы методом случайного мутагенеза *virG* (Scheeren-Groot et al., 1994). Эти мутации картируются в пределах кодирующей последовательности белка. Некоторые мутации N-терминального домена не влияют на фосфорилирование, хотя влияние мутаций на кинетику реакций не выявлено. Мутанты, картируемые в С-концевом домене, обычно дефектны по транскрипционной активации, но не по фосфорили-

рованию и связыванию ДНК. Возможно, что эти мутации влияют на взаимодействие VirG и РНК-полимеразы (или транскрипционного механизма). Три мутанта в С-концевом домене (*virGL156P*, *virGR194K* и *virGE208G*) дефектны по связыванию с ДНК *in vitro* (Scheeren-Groot et al., 1994). Два из них дефектны также по фосфорилированию. Если эти мутантные белки не пострадали в процессе очистки (она включала денатурацию и ренатурацию белков), существование этих мутантов показывает, что С-концевой домен влияет и на структуру N-концевого домена.

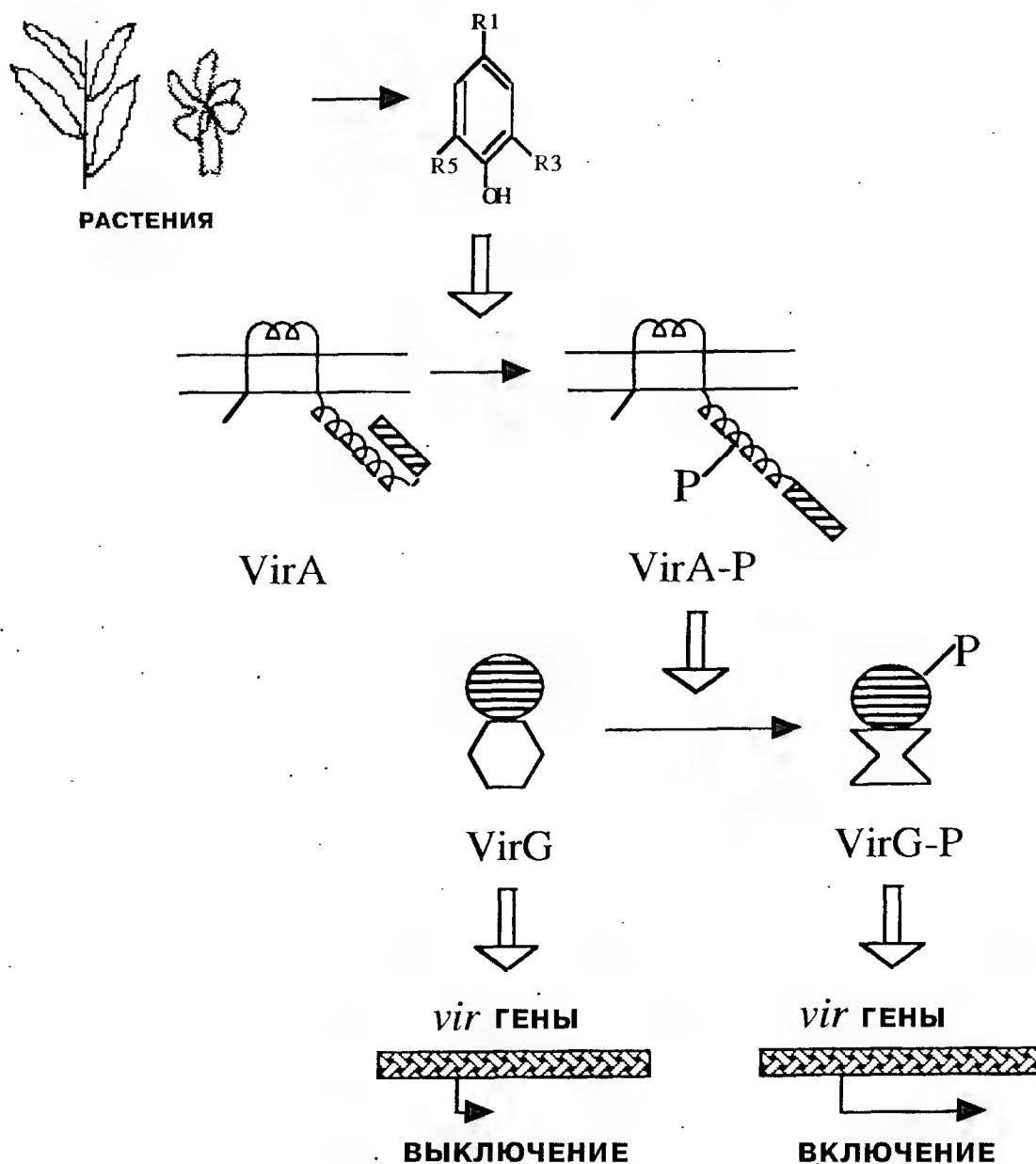


Рисунок 3. Модель индукции экспрессии *vir*-генов (объяснения в тексте).

Транскрипционная активация посредством VirG требует фосфорилирования. В условиях *in vitro* белок VirA фосфорилирует VirG по аспартату-52 (Jin et al., 1990a). Изучение гомологов VirG — OmpR, PhoB и NtrC, показало возможные механизмы транскрипции *vir*-генов. Она требует формирования закрытого комплекса ДНК с РНК-полимеразой, а затем превращения этого комплекса в открытый. *In vitro* РНК-полимераза связывается с *vir*-промоторами не эффективно. Формирование ДНК—РНК-полимеразного комплекса активируется конститутивным мутантным белком VirGN54D, но не VirG, то есть формирование закрытого комплекса осуществляется при активации VirG (данные авторов). Сходный механизм используется активаторами *E. coli* OmpR и PhoB (Tsung et al., 1990; Makmo et al., 1993). Другой гомолог VirG — NtrC запускает транскрипцию, активируя превращение закрытого промоторного комплекса в открытый (Ninfa et al., 1987; Popham et al., 1989).

Фосфорилирование некоторых гомологов VirG влияет на связывание с ДНК. Сродство белков по отношению к сайтам связывания при фосфорилировании повышается примерно в 10 раз (Alba et al., 1989; Roggiam, Dubau, 1993; Nakashima et al., 1993). Подобный механизм может быть применим и к VirG. Мутантный белок VirGN54D имеет большее сродство к *vir*-боксу, чем белок дикого типа (Han, Winans, 1994). Фосфорилирование NtrC не влияет на сродство к ДНК, но активирует взаимодействие белков при связывании (Weiss et al., 1992). Третий эффект фосфорилирования — олигомеризация белка (Fiedler, Weiss, 1995). Воспринимающий домен регуляторов является олигомеризующимся. Считается, что output-домен ингибирует его димеризацию в отсутствии индуктора. При фосфорилировании воспринимающий домен димеризуется, активируя новые функции. Фосфорилирование NtrC и PhoB индуцирует олигомеризацию. Олигомеризация NtrC активирует его АТФ-азную, но не ДНК-связывающую активность (Mettke et al., 1995). Фосфорилирование OmpR индуцирует конформационные изменения, которые приводят к изменению чувствительности к протеазам (Kenney et al., 1995).

IV. Заключение

Существенные особенности регуляции *vir*-генов суммированы на рисунке 3.

Растительные клетки выделяют фенольные факторы, которые действуют как сигналы для индукции *vir*-генов. В Ti-плазмиде локализованы гены *virA* и *virG*, необходимые для индукции *vir*-генов. Белок VirA — сенсор растительных сигнальных молекул, его взаимодействие с индуктором активирует протеинкиназную активность, приводя к автофосфорилированию консервативного гистидина в положении 474. Активация киназной функции может быть связана со структурными изменениями в С-концевом домене белка. Сродство VirA к индуктору увеличивается посредством белка ChvE, кодируемого бактериальной хромосомой. Затем VirA фосфорилирует VirG по консервативному остатку аспарагиновой кислоты в положении 52, приводя к конформационным изменениям в С-концевом ДНК-связывающем домене. Фосфо-VirG активирует транскрипцию всех *vir*-генов. Эта активация, вероятно, является результатом повышения сродства фосфо-VirG к сайтам связывания, а также результатом его продуктивного взаимодействия с РНК-полимеразой.

V. Благодарности

Мы благодарим наших коллег за предоставление неопубликованных результатов. Работа лаборатории авторов проходит при поддержке грантов US National Institutes of Health и American Cancer Society Faculty Research Award.

VI. Литература

- Alba H., Nakasai F., Mizushima S., Mizuno T. (1989) J. Biochem. V. 106, p. 5-7.
Ankenbauer R., Best E., Palanca C., Nester E. (1991) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 4, p. 400-406.
Aoyama T., Hirayama T., Tamamoto S., Oka A. (1989) Gene. V. 78, p. 173-178.
Aoyama T., Takanami M., Makmo K., Oka A. (1991) Mol. Gen. Genet. V. 227, p. 385-390.
Aoyama T., Takanami M., Oka A. (1989) Nucl. Acids Res. V. 17, p. 8711-8725.

- Banta L., Joerger R., Howrtz V., Campbell A., Binns A. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 3242-3249.
- Beijersbergen A., Dulk-Ras A.D., Schilperoort R.A., Hooykaas P.J. (1992) *Science*. V. 256, p. 1324-1327.
- Berger B.R., Christie P.J. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 1723-1734.
- Binns A., Beaupre C., Dale E. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 4890-4899.
- Braun A.C. (1958) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 44, p. 344-349.
- Cangelosi G., Ankenbauer R., Nester E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 87, p. 6708-6712.
- Chang C.-H., Winans S. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 7033-7039.
- Chang C.-H., Zhu J., Winans S.C. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 4710-4716.
- Christie P.J., Ward J.E., Winans S., Nester E.W. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 2659-2667.
- Citovsky V., Wong M.L., Zambryski P. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 86, p. 1193-1197.
- Citovsky V., Zupan J., Wanuck D., Zambryski P. (1992) *Science*. V. 256, p. 1802-1805.
- Close T.J., Rogowski R., Kado C., Winans S., Yanofsky M., Nester E. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 5113-5118.
- Close T.J., Tail R.C., Kado C.I. (1985) *J. Bacteriol.* V. 164, p. 774-781.
- Cooley M.B., D'Souza M.R., Kado C.I. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 2608-2616.
- Das A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 85, p. 2909-2913.
- Das A. (1997) *Subcellular Biochem. Plant Microbe Interact.* Plenum Publ. Corp. London (in press).
- Das A., Pazour G. (1989) *Nucl. Acids Res.* V. 17, p. 4541-4550.
- Das A., Stachel S., Ebert P., Allenza P., Montova A., Nester E. (1986) *Nucl. Acids Res.* V. 14, p. 1355-1364.
- Doty S.L., Yu M.C., Lundin J.L., Heath J.D., Nester E.W. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 961-970.
- Fernandez D., Spudich G., Zhou X.-R., Christie P. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 3168-3176.
- Fiedler U., Weiss V. (1995) *EMBO J.* V. 14, p. 3696-3705.
- Garfinkel D., Nester E. (1980) *J. Bacteriol.* V. 144, p. 732-743.
- Gubba S., Xie Y.-H., Das A. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 788-791.
- Guyon P., Chilton M.-D., Petet A., Tempe J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 65, p. 2693-2697.
- Han D., Chen C., Chen Y., Winans S.C. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 7040-7043.
- Han D., Winans S. (1994) *Mol. Microbiol.* V. 12, p. 23-30.
- Holsters M., Villarroel R., Geilen J., Scunck J., OeGreve H., Van Montagu M., Schell J. (1983) *Mol. Gen. Genet.* V. 190, p. 35-41.
- Hooykaas P.J., Beyersbergen A.G. (1994) *Annu. Rev. Phytopathol.* V. 32, p. 157-179.
- Huang M., Cangelosi G., Halpenn W., Nester E. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 1814-1822.
- Huang Y., Morel P., Powell B., Kado C. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 1142-1144.
- Jayaswal R., Veluthambi K., Gelvin S., Slightom J. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 5035-5045.
- Jin S., Prusti R., Roitsch T., Ankenbauer R., Nester E. (1990a) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 4945-4950.
- Jin S., Roitsch T., Ankenbauer R., Gordon M., Nester E. (1990b) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 525-530.
- Jin S., Roitsch T., Chnstie P., Nester E. (1990c) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 531-537.
- Jin S., Song Y., Deng W., Gordon M., Nester E. (1993a) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 6830-6835.
- Jin S.G., Song Y.N., Pan S.Q., Nester E.W. (1993b) *Mol. Microbiol.* V. 7, p. 555-562.
- Kanemoto R.H., Powell A.T., Akiyoshi D.E., Regier D.A., Kerstetter R.A., Nester E.W., Hawes M.C., Gordon M.P. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 2506-2512.
- Kenney I., Bauer M., Silhavy T. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 92, p. 8866-8870.
- Kolb A., Busby S., Buc H., Garges S., Adhya S. (1993) *Annu. Rev. Biochem.* V. 1993, p. 749-795.
- Koukolikova-Nicola Z., Ramen D., Stephens K., Ramos C., Tinland B., Nester E.W., Hohn B. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 723-731.
- Kuldau G.A., De Vos G., Owen J., McCaffley G., Zambryski P. (1990) *Mol. Gen. Genet.* V. 221, p. 256-266.
- Lee K., Dudley M., Hess K., Lynn D., Joerger R., Binns A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 89, p. 8666-8670.
- Lee Y.-W., Jin S., Sim W.-S., Nester E.W. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 92, p. 12245-12249.
- Leroux B., Yanofsky M., Winans S., Ward J., Ziegler S., Nester E. (1987) *EMBO J.* V. 6, p. 849-856.
- Mactuda Y., Shimoda N., Yamamoto-Toyoda A., Takahashi Y., Nishihama R., Aoki S., Matsuoka K., Nakamura K., Yoshioka Y., Ohba T., Ohata T. (1993) *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, Kluwer Academic Publishers, Utrecht, p. 85-96.
- Makmo K., Anemura M., Kim S.-K., Nakata A., Shmagawa H. (1993) *Genes & Development*. V. 7, p. 149-160.
- Mantis N., Winans S. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 1189-1196.
- McBride K.E., Knauf V.C. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 1430-1437.
- McLean B.G., Greene E.A., Zambryski P.C. (1994) *J. Biol. Chem.* V. 269, p. 2645-2651.
- Melchers L.D.T., Idler K., Schilperoort R., Hooykaas P. (1986) *Nucl. Acids. Res.* V. 14, p. 9933-9940.
- Melchers L., Maroney M.J., Dulk-Ras A., Thompson D.S., van Vuuren H., Schilperoort R.A., Hooykaas P. (1990) *Plant Mol. Biol.* V. 14, p. 249-259.
- Melchers L.S., Regensburg-Tuink T., Bourret R., Sedee J., Schilperoort R., Hooykaas P. (1989a) *EMBO J.* V. 8, p. 1919-1925.
- Melchers L., Regensburg-Tuink A., Schilperoort R., Hooykaas P. (1989b) *Mol. Microbiol.* V. 3, p. 969-977.
- Melchers L.S., Thompson D., Idler K., Neuteboom S., de Maagd R., Schilperoort R., Hooykaas P. (1987) *Plant Mol. Biol.* V. 9, p. 635-645.
- Menage A., Morel G. (1964) *C.R. Acad. Sci.* V. 259, p. 4795-4796.

- Messens E., Dekeyser R., Stachel S.E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 87, p. 4368-4372.
- Mettke J., Fiedler U., Weiss V. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 5056-5061.
- Moore L., Warren G., Strobel G. (1979) *Plasmid*. V. 2, p. 617-626.
- Morris J., Morris R.O. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 87, p. 3614-3618.
- Nakashima K., Sugiura A., Kanamaru K., Mizuno L. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 7, p. 109-116.
- Ninfa A.J., Reitzer L.J., Magasanik B. (1987) *Cell*. V. 50, p. 1039-1046.
- Okamoto S., Toyoda-Yamamoto A., Ito K., Takebe I., Machida Y. (1991) *Mol. Gen. Genet.* V. 228, 24-32.
- Ooms G., Kalpwijk P.M., Poulis J.A., Schilperoort R.A. (1980) *J. Bacteriol.* V. 144, p. 82-91.
- Otten L., DeGreve H., Leemans J., Hain R., Hooykaas P., Schell J. (1984) *Mol. Gen. Genet.* V. 175, p. 159-163.
- Otten L., Piotrowiak G., Hooykaas P., Dubois M., Szegedi E., Schell J. (1985) *Mol. Gen. Genet.* V. 199, p. 189-193.
- Pan S., Charles T., Jin S., Wu Z.-L., Nester E. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 90, p. 9939-9943.
- Parkinson J., Kofbid E. (1992) *Annu. Rev. Genet.* V. 26, p. 71-112.
- Pazour G.J., Das A. (1990a) *Nucl. Acids Res.* V. 18, p. 6909-6913.
- Pazour G.J., Das A. (1990b) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 1241-1249.
- Pazour G.J., Ta C.N., Das A. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 88, p. 6941-6945.
- Pazour G.J., Ta C.N., Das A. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 4169-4174.
- Peralta E.G., Hellmiss R., Ream W. (1986) *EMBO J.* V. 5, p. 1137-1142.
- Peralta E.G., Ream W. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 82, p. 5112-5116.
- Petit A., Tempe J. (1985) In: van Vloten-Doting L., Groot G., Hall T., eds. *Molecular Form and Function of the Plant Genome*, Plenum, New York, p. 625-636.
- Popham D., Szeto D., Keener J., Kustu S. (1989) *Science*. V. 243, p. 629-635.
- Porter S.G., Yanofsky M.F., Nester E.W. (1987) *Nucl. Acids Res.* V. 15, p. 7503-7517.
- Powell B., Kado C. (1990) *Mol. Microbiol.* V. 4, p. 1-8.
- Powell B., Powell G., Morris R., Rogowsky P., Kado C. (1987) *Mol. Microbiol.* V. 1, p. 309-316.
- Regensburg-Tuink A., Hooykaas P.J. (1993) *Nature*. V. 363, p. 69-71.
- Roggiani M., Dubnau D. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 3181-3187.
- Rogowsky P.M., Powell B., Shirasu K., Lin T., Morel P., Zyprian E., Steck T., Kado C. (1990) *Plasmid*. V. 23, p. 85-106.
- Roitsch T., Wang H., Jin S., Nester E. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 6054-6060.
- Scheeren-Groot E., Rodenburg K., Dulk-Ras A., Turk S., Hooykaas P. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 6418-6426.
- Sen P., Pazour G.J., Anderson D., Das A. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 2573-2580.
- Shimoda N., Toyoda-Yamamoto A., Nagamine J., Usami S., Katayama M., Sakagami Y., Machida Y. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 87, p. 6684-6688.
- Shirasu K., Kado C. (1993) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 111, p. 287-294.
- Smith E.F., Townsend C.O. (1907) *Science*. V. 25, p. 671-673.
- Soderling T. (1990) *J. Biol. Chem.* V. 265, p. 1823-1826.
- Spencer P., Tanaka A., Towers G. (1990) *Phytochemistry*. V. 29, p. 3785-3788.
- Stachel S., Messens E., Van Montagu M., Zambryski P. (1985) *Nature*. V. 318, p. 624-629.
- Stachel S., Nester E. (1986) *EMBO J.* V. 5, p. 1445-1454.
- Stachel S.E., Nester E.W., Zambryski P.C. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 83, p. 379-383.
- Stachel S., Timmerman B., Zambryski P. (1986) *Nature*. V. 322, p. 706-712.
- Stachel S., Zambryski P. (1986) *Cell*. V. 46, p. 325-333.
- Steck T., Morel P., Kado C. (1988) *Nucl. Acids Res.* V. 16, p. 8736.
- Stock J., Ninfa A., Stock A. (1989) *Microbiol. Rev.* V. 53, p. 450-490.
- Sundberg C., Meek L., Canoil K., Das A., Ream W. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 1207-11212.
- Suzuki M. (1993) *EMBO J.* V. 12, p. 3221-3226.
- Tamamoto S., Aoyama T., Takanami M., Oka A. (1990) *J. Mol. Biol.* V. 215, p. 537-547.
- Thompson D.V., Melchers L.S., Idler K.B., Schilperoort R.A., Hooykaas P.J. (1988) *Nucl. Acids Res.* V. 16, p. 4621-4636.
- Thorstenson Y.R., Kuldau G.A., Zambryski P.C. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 5233-5241.
- Tsung K., Brissette R., Inouye M. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 87, p. 5940-5944.
- Turk S., Melchers L., den Dulk-Ras H., Regensburg-Tuink A., Hooykaas P. (1991) *Plant Mol. Biol.* V. 16, p. 1051-1059.
- Turk S., Nester E., Hooykaas P. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 7, p. 719-724.
- Turk S., van Lange R., Regensburg-Tuink T., Hooykaas P. (1994) *Plant Mol. Biol.* V. 25, p. 899-907.
- Usami S., Okamoto S., Takebe I., Machida Y. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 85, p. 3748-3752.
- Van Haaren M.J.J., Sedee N., Schilperoort R., Hooykaas P. (1987) *Nucl. Acids Res.* V. 15, p. 8983-8997.
- Vogel A.M., Das A. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 303-308.
- Vogel A., Das A. (1994) *Mol. Microbiol.* V. 12, p. 811-817.
- Wang K., Herrerra-Estrella L., Van Montagu M., Zambryski P. (1984) *Cell*. V. 38, p. 455-462.
- Ward J.E., Akiyoshi D.E., Regier D., Datta A., Gordon M.P., Nester E. (1988) *J. Biol. Chem.* V. 263, p. 5804-5814.
- Ward J.E., Akiyoshi D.E., Regier D., Datta A., Gordon M.P. (1990) *J. Biol. Chem.* V. 265, p. 4768.
- Ward J.E., Dale E.M., Nester E.W., Binns A.N. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 5200-5210.
- Weiss V., Claverie-Martin F., Magasanik B. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 89, p. 5088-5092.
- White F., Nester E. (1980) *J. Bacteriol.* V. 144, p. 710-720.
- Winans S. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 2433-2438.
- Winans S., Allenza P., Stachel S., McBride K., Nester E. (1987) *Nucl. Acids Res.* V. 15, p. 825-836.

- Winans S., Ebert P., Stachel S., Gordon M., Nester E. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 83, p. 8278-8282.
- Winans S., Jin S., Komari T., Johnson K., Nester F. (1987) In: von Wettstein. D. et al., eds. *Plant Molecular Biology*, Plenum Press, New York, p. 573-582.
- Winans S., Kersletter R., Nester E. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 4047-4054.
- Yadav N.S., Bennett D.R., Barrier W.M., Chilton M.D. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 79, p. 6322-6326.
- Yanofsky M.F., Lowe B., Montoya A., Rubm R., Krul W., Gordon M., Nester E.W. (1985) *Mol. Gen. Genet.* V. 201, p. 237-246.
- Yanofsky M.F., Nester E.W. (1986) *J. Bacteriol.* V. 168, p. 237-243.
- Yoshioka Y., Takahashi Y., Matsumoto S., Kojima S., Matsuoka K., Nakamura K., Ohshima K., Okada N., Machida Y. (1994) In: Kado C., Crosa J., eds. *Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, the Netherlands, p. 231-248.
- Yusibov V., Steck T., Gupta V., Gelvin S. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 91, p. 2994-2998.
- Zambryski P., Depicker A., Kruger K., Goodman H. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* V. 1, p. 361-370.
- Zerback R., Dressier R., Hess D. (1989) *Plant Science.* V. 62, p. 83-91.
- Zupan J., Zambryski P. (1995) *Plant Physiol.* V. 107, p. 1041-1047.

Функции Vir - белков Ti-плазмид: формирование T-комплекса и перенос в растительную клетку

Круз Ф., Ланка Э.

I.	Введение.....	305
II.	Перенос T-ДНК - особая форма бактериальной конъюгации.....	306
	II.A. Функциональное сходство.....	306
	II.B. Сходство последовательностей.....	307
III.	Образование T-нитей.....	310
IV.	Активация T-нитей.....	312
	IV.A. Перенос T-ДНК и бактериальная конъюгация могут использовать различные стратегии для процессинга T-ДНК.....	312
	IV.B. VirD4 как молекулярный мотор и вероятный передатчик сигнала спаривания.....	315
V.	VirB - транспортная структура.....	316
	V.A. Какова функция комплекса VirB в переносе T-ДНК из <i>Agrobacterium</i> ?.....	316
	V.B. Компоненты комплекса VirB.....	317
	V.C. Сходство белков VirB и белков пилей системы конъюгативного переноса.....	322
VI.	Опероны <i>virE</i> и <i>virF</i>	322
VII.	Аналогии с другими системами транспорта белков: перенос T-комплекса и конъюгация используют путь экспорта белков IV-го типа.....	323
VIII.	Благодарности.....	324
IX.	Литература.....	324

I. Введение

Перенос T-ДНК из *Agrobacterium tumefaciens* в растительные клетки - уникальный процесс генетического обмена между представителями разных царств живого, который происходит в природе с заметной частотой. Механизм такого переноса, вероятно, характерен для широкого спектра хозяев, поскольку агробактерии могут переносить T-ДНК даже в дрожжи (Bundock et al., 1995; Piers et al., 1996). Несмотря на свою уникальность, механизм инфекции, используемый *Agrobacterium*, сходен с универсальным механизмом генетического обмена при бактериальной конъюгации. Поэтому очень важно выяснить, почему именно агробактерии имеют столь эффективный механизм адаптации к условиям окружающей среды, как "межцарственный" перенос генов, в то время как остальные бактерии не смогли приобрести эту способность. Этот вопрос не является праздным, поскольку ряд бактериальных плазмид может быть перенесен в дрожжи посредством конъюгации (Heinemann et al., 1989). Детальное выяснение механизма переноса T-ДНК в растительные клетки может пролить свет на причины возникновения столь специализированной стратегии экологической адаптации. Кроме того, перенос генов в растения представляет интерес для биотехнологов.

Несмотря на теоретическую и практическую важность понимания переноса T-ДНК из *Agrobacterium*, мы еще мало знаем об этом процессе. Начальные этапы процессинга T-ДНК проанализированы в деталях, но этапы, посредством которых T-нить активируется для транспорта и переносится в растительную клетку, до сих пор остаются загадочными. Цель нашей статьи -- описать то, что мы уже знаем, и наметить вопросы, ответы на которые были бы желательны. По-

сколько молекулярные аспекты переноса Т-ДНК детально рассмотрены в обзорах (Zambryski, 1992; Hooykaas et al., 1994; Kado, 1994; Lessl et al., 1994; Lanka et al., 1995; Baron et al., 1996; Firth et al., 1996; Pansegrau et al., 1996; Winans et al., 1996), мы обратим особое внимание на аналогию между этим процессом и бактериальной конъюгацией.

Перенос Т-ДНК может быть подразделен на несколько функциональных этапов: (а) образование контакта между *Agrobacterium* и растительными клетками, (b) активация экспрессии оперонов, вовлеченных в синтез Vir-белков, (с) процессинг Т-ДНК посредством формирования комплекса одностречевой Т-ДНК с белками VirD2 и VirE2, (d) активация Т-нити для транспорта, (е) перенос комплекса Т-ДНК в растительную цитоплазму через транспортную структуру, состоящую из белков VirB, (f) перенос Т-ДНК в ядро клетки, (g) интеграция в хромосому. В разделе II мы покажем, что некоторые из этих этапов (с, d и е) характерны и для бактериальной конъюгации. Другие этапы являются уникальными для переноса Т-ДНК (а, b, f и g), они рассмотрены в других главах книги. Известно, что контакт между *Agrobacterium* и растительной клеткой (глава II) и транскрипционная активация *vir*-оперонов приводят к синтезу белков VirA, B, C, D, E, F, G, H и J (глава 13). Следующий этап (с) - процессинг Т-ДНК и формирование Т-нити в клетке *Agrobacterium* - будет рассмотрен в разделе III, активация Т-нити (d) - в разделе IV, и транспорт ДНК (е) - в разделе V. Наибольшего внимания заслуживает то, что один и тот же транспортный комплекс используется для переноса Т-ДНК и транспорта белков VirE2 и VirF, что описано в разделе VI. Наконец, все данные отражаются в модели транспорта Т-ДНК описанной в разделе VII. Этапы f и g обсуждаются в главе 15.

II. Перенос Т-ДНК — особая форма бактериальной конъюгации

Фрагмент ДНК из Ti-плазмид *Agrobacterium tumefaciens*, называемый Т-ДНК (от англ. transferred DNA), может эффективно передаваться из бактерий в растительные клетки. Он представляет собой ДНК, находящуюся между двумя специфическими последовательностями Ti-плазмиды, называемыми правой и левой границами (RB и LB, от: right и left border). На молекулярном уровне это выглядит следующим образом: сегмент, содержащий Т-ДНК, вырезается по RB и LB, одна нить (Т-нить) отделяется и передается в растительные клетки посредством закодированного в Ti-плазмиде мультипротеинового транспортного аппарата. Поскольку в растительной клетке Т-ДНК остается в одностречевой форме, она далее транспортируется в ядро, по всей вероятности, с участием сигналов ядерной локализации, присутствующих в белках VirD2 и VirE2, и интегрируется в хромосому хозяина по механизму незаконной рекомбинации более или менее случайно. Этому может предшествовать репликация и образование двунитевой молекулы Т-ДНК. Анализ структурных и функциональных аспектов этого переноса показывает, что он сходен с бактериальной конъюгацией.

II.A. ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СХОДСТВО

Многие этапы переноса Т-ДНК, как и конъюгации, мало изучены. Однако для относительно хорошо изученных этапов сходство между данными процессами весьма значительно.

(а) *Процессинг Т-ДНК*. Первый этап образования Т-нити - разрезание Т-ДНК Ti-плазмиды по RB и LB. Этот процесс катализируется белками VirD1 и VirD2. При воспроизведении процесса *in vitro* комплекс VirD1/VirD2 катализирует те же реакции, которые происходят при релаксации конъюгативных плазмид. VirD2 в одиночку, как это происходит при релаксации, катализирует разрезание и перекидывание нити по модели олигонуклеотидов и плазмид, содержащих *nis*-сайты (Pansegrau et al., 1993b). Для этого процесса необходимы ионы Mg^{2+} , источник энергии не требуется, а сама реакция обратима. Вследствие реакции разрезания специфический тирозильный остаток VirD2 ковалентно связывается с 5'-концом разреза фосфодиэфирной связью. Фосфотирозильная связь гидролизует и воссоединяется в процессе переноса нити (Pansegrau et al., 1993b). VirD1, как показано для релаксазо-ассоциированных белков, необходим (вместе с VirD2) для надрезания суперспирализованной ДНК, содержащей *nis* (Scheiffele et al., 1995). В последующей реакции 3'-конец *nis*-сайта тесно примыкает к комплексу, так что может быть заполнен ДНК-полимеразой.

Таким образом, начальные шаги процессинга при транспорте Т-ДНК и конъюгации в значительной степени эквивалентны.

Перенос Т-ДНК требует наличия в *cis*-положении только RB. Процесс, однако, более эффективен при наличии дополнительной последовательности, называемой *overdrive* (Peralta et al., 1985; van Haaren et al., 1987). Комбинация этих двух последовательностей аналогична конъюгативной *oriT*. При делеции RB опухолообразование не наблюдается, в то время как удаление LB не влияет на вирулентность (Joos et al., 1983). Таким образом, перенос Т-ДНК происходит однопавленно. Изменение ориентации RB приводит к переносу очень длинных Т-нитей (>170 т.п.н.), охватывающих всю Ti-плазмиду (Miranda et al., 1992). Эти процессы также очень сходны с процессами конъюгативного переноса ДНК.

(b) *Мобилизация плазмид*. *vir*-гены могут контролировать перенос мелких плазмид, подобных RSF1010, как в растительные клетки, так и в другие бактерии (Buchanan-Wollaston et al., 1987; Beyersbergen et al., 1992). Для мобилизации требуются комплекс VirB и белок VirD4. Других Vir-белков, таких как VirD1/VirD2, или VirE2, для этого не требуется. Аналогичные белки необходимы для мобилизации RSF1010 посредством конъюгативных плазмид, таких как RP4. При этом важны компоненты, обеспечивающие формирование пар, а также TraG-подобные белки, в то время как релаксазы и дополнительные белки конъюгативных хелперных плазмид не обязательны (Lessi et al., 1993; Cabezon et al., 1994; Cabezon et al., 1997). Таким образом, комплекс транспорта Т-ДНК может работать как на конъюгативных релаксосомах, так и на интермедиатах Т-нити, показывая их функциональную эквивалентность. Интересно, что RSF1010 ингибирует VirB-опосредованный перенос в растительные клетки Т-ДНК (частично) и VirE2 (полностью) (Binns et al., 1995). Этот факт может быть объяснен конкуренцией за транспортные сайты.

(c) *Половые пили*. Образование пилей – наиболее заметная морфологическая характеристика конъюгирующих бактерий. Поскольку структурные и функциональные характеристики предполагают высокую степень аналогии между переносом Т-ДНК и конъюгацией, было логично предположить участие пилей в транспорте Т-ДНК. Это предположение стимулировало поиск Vir-зависимых пилей, а их открытие подтвердило сходство конъюгации и переноса Т-ДНК. У *Agrobacterium* аппарат, подобный пилям, образуется при экспрессии генов *virB* и *virD4*. Существует корреляция между образованием пилей и способностью переносить RSF1010, поскольку для обоих процессов требуются одни и те же компоненты (Fullner et al., 1996b). Кроме того, для образования Vir-пилей агробактерии должны расти при 19–22°C. При 28°C, обычной для *Agrobacterium* температуре роста, пили не образуются. Интересно то, что мобилизация RSF1010 посредством Vir-белков, как в направлении бактерий, так и в направлении растений, является также температуро-зависимым процессом, что показывает взаимосвязь данных явлений (Fullner et al., 1996a). Для формирования пилей в случае конъюгативных плазмид требуются белки, родственные VirB, необходимые для образования пар при конъюгации, но не TraG-подобные белки (Pansegrau et al., 1996).

II.В. СХОДСТВО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Логично предположить, что опероны *virD* и *virB* требуются для тех этапов переноса Т-ДНК, которые сходны с конъюгацией, в то время как другие опероны (*virA*, *virG*, *virF*, *virH*, *virJ*) вовлечены в регуляцию или в иные этапы переноса Т-ДНК. Опероны *virC* и *virE* имеют как уникальные особенности, так и ряд сходств с компонентами конъюгативной системы (раздел VI). В основных оперонах существуют обширные области со сходными последовательностями.

(a) *Vir-белки*. Существует значительное сходство последовательностей продуктов *vir*-генов и *tra*-генов различных плазмид, включая кодируемую Ti-плазмидой конъюгативную систему, работающую при переносе ДНК между агробактериями (глава 10), а также конъюгативную систему плазмиды pNGR234a *Rhizobium*, ответственной за симбиоз с бобовыми (Freiberg et al., 1997). Это сходство касается оперона, включающего большую часть транспортных белков, *virB* (раздел IV), а также оперонов, вовлеченных в процессинг ДНК, например, *virC*, *virD* и *virE*, (Kado, 1994; Lessl et al., 1994). Кроме того, выявлено сходство белков VirB и продуктов двух кластеров генов, вовлеченных в контроль вирулентности бактерий: белков Ptl, ответственных за экспорт токсина из *Bordetella*

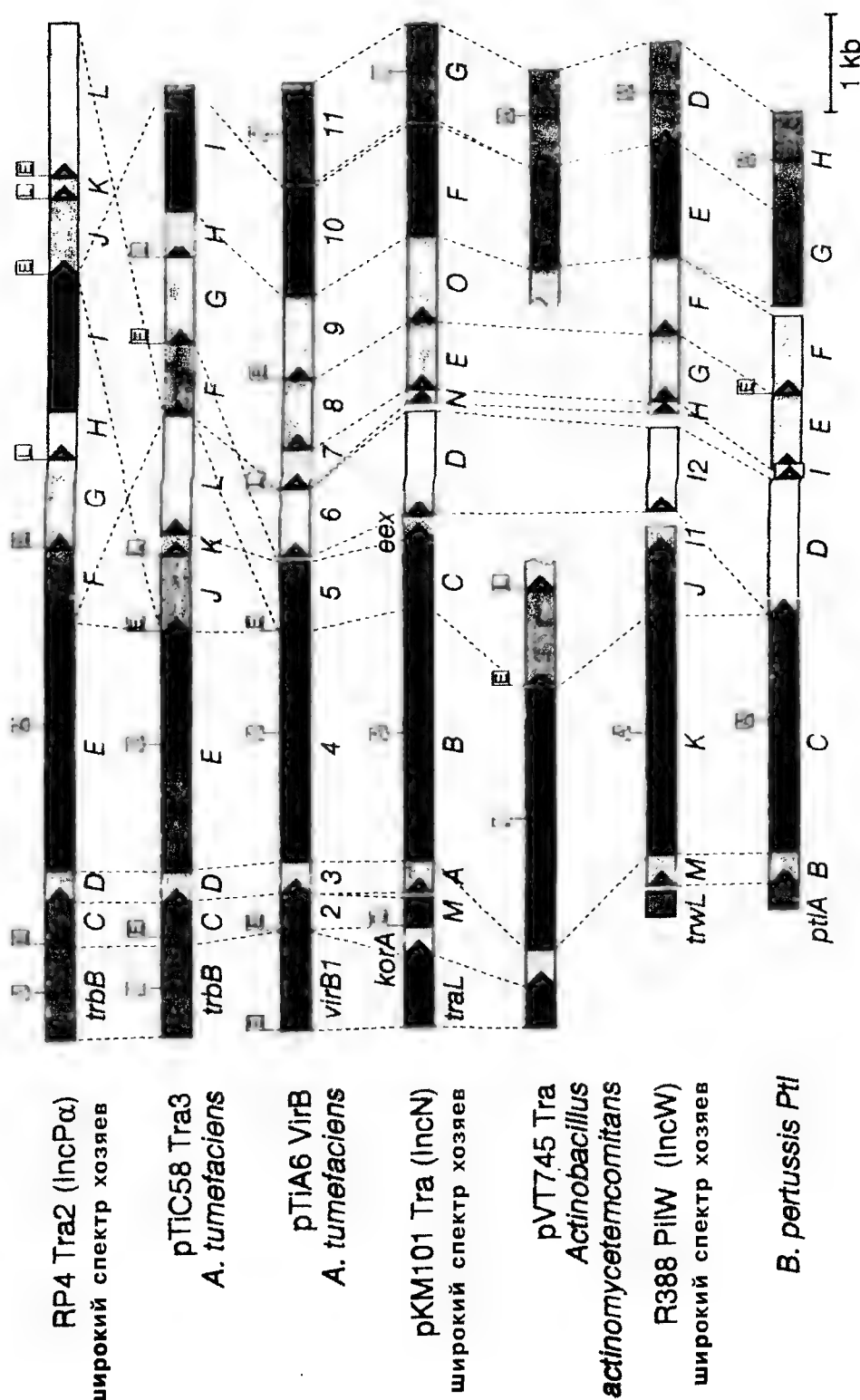


Рисунок 1. Консервативная организация генов, кодирующих системы белкового транспорта, связанные с транспортом ДНК у бактерий. Гены, кодирующие сходные продукты, соединены пунктиром или показаны одним цветом. Флажки с буквой "Е" обозначают сайты разрезания сигнальной пептидазой *Lep. E. coli*. Флажки с буквой "L" обозначают сайты разрезания липопротеиназного декор N-концов соответствующих белков. Консервативные нуклеотид-связывающие домены типа А обозначены флажками с буквой "А". В опероне *Ptl* гены D и I частично перекрываются, что обозначено зигзагообразным положением полос. Ссылки/номера по GenBank: IncPa RP4 Tra2 ((Lessl *et al.*, 1992a)/ M93696); pTIC58 Tra3 ((Alt-Morbe *et al.*, 1996)/U43674 and U43675). pTiA6 VirB ((Ward *et al.*, 1988)/J03216); pKM101 ((Pohlman *et al.*, 1994)/U09868). pVT745 (D. Galli, D. Leblanc, личное сообщение); R388 *Ptl* ((Boiland, 1992; Rivas *et al.*, 1997)/X81123); *B. pertussis Ptl* ((Weiss *et al.*, 1993)/L10720). Область конъюгативного переноса крупной плазмиды pNGR234 *Rhizobium* ((Freiberg *et al.*, 1997)/U00090 имеет организацию генов, сходную с Tra-областью T1-плазмид *Agrobacterium*, и не включен в схему.

Таблица 1. Сходство последовательностей *cag*-области *Helicobacter pylori* с генами, контролирующими перенос ДНК

Система переноса	<i>cagI</i> -область		<i>cagII</i> -область		
<i>Helicobacter pylori</i>	CagE	Orf110	Orf11	Orf13	Orf15
RP4	TrbE	TraG	TrbB	TrbI	?
R388	TrwK	TrwB	TrwD	TrwE	TrwF
Ti/vir	VirB4	VirD4	VirB11	VirB 10	VirB9

pertussis (Weiss et al., 1993), и белков Cag, играющих пока еще не известную роль в патогенности *Helicobacter pylori* (Censmi et al., 1996; Tomb et al., 1997; табл. 1; эти две системы обсуждаются в разделе VII).

(b) *Организация генов*. На рисунке 1 представлен оперон *virB* в сравнении с оперонами, контролирующими формирование пор для переноса конъюгативных плазмид. Как отмечалось ранее, генная организация оперонов *vir* и *tra* сходна (Kado, 1994; Lessl et al., 1994). Оказалось, что порядок генов сходен для *virB* и *tra*-оперонов из плазмиды pKM101 (IncN группа). В случае R388 (IncW группа) отсутствует только гомолог *virB1*, хотя он может находиться “выше по течению” в еще не отсеквенированной области (Bolland, 1992). Необходимо отметить, что *virB1* не является существенным для транспорта Т-ДНК (раздел IV). Дополнительные различия найдены между *virB* и близкородственными оперонами RP4-Tra2 и Ti-Tra3. В этом случае *trbB*, гомолог *virB11*, локализован “выше по течению” от остальных генов, тогда как *trbL*, гомолог *virB6* из RP4 - “ниже по течению”, а гомологи *virB8* и *virB9* отсутствуют. Другие последствия возможной перестановки генов показаны на рисунке 1а. Более слабое сходство выявлено между пятью белками VirB и продуктами транспортных генов F, TraA (VirB2), TraB (VirB10), TraC (VirB4), TraE (VirB5), и TraL (VirB3) (Kado, 1994). Очевидно, что обсуждаемая здесь транспортная система широко распространена среди микроорганизмов.

Опероны *virD*, *virE* и *virC* также имеют гомологов в конъюгативных системах (Lessl et al., 1994; Pansegrau et al., 1996). В частности, *virD* можно сравнить с оперонами, вовлеченными в процессинг ДНК конъюгативных плазмид и содержащими релаксазу и дополнительные белки. В таблице 2 указаны названия гомологичных белков из различных систем.

(c) *Классификация*. Конъюгативные системы могут быть разделены на четыре семейства, в соответствии с организацией консервативных районов релаксаз, а также *nic*-сайтов (Lanka et al., 1995). В пределах одного семейства существует сходство обширных аминокислотных последовательностей релаксаз и нуклеотидная консервативность *nic*-сайтов. Между семействами выявлено только сходство определенных мотивов, которые являются характерными для релаксаз, что показано на рисунке 2. По этой классификации, VirD2 и Т-границы относятся к Р-семейству систем конъюгативного транспорта.

Показано, что между релаксазами Р-типа существует значительное сходство (Pansegrau et al., 1991, 1994), *nic*-сайты Р-типа также консервативны (рис. 3). Как видно из рисунка 2, конъюгативные релаксазы, включая VirD2, составляют крупное суперсемейство, в котором представлены белки из практически всех конъюгативных или мобилизуемых систем, от плазмид грам-положительных бактерий до конъюгативных транспозонов. Наиболее значимыми в данном суперсемействе являются мотивы I и III. Мотив I содержит остаток тирозина, который формирует ковалентную связь с ДНК. Мотив III, который содержит серию из трех консервативных остатков гистидина, считается непосредственно вовлеченным в реакцию (Pansegrau et al., 1996). Кроме того, на рисунке 3 показано, что Т-границы и *nic*-сайты имеют меньшую консервативность по отношению к консенсусной последовательности. Хотя это сходство не полное, большинство конъюгативных систем бактерий родственны, а их консервативные элементы также присутствуют в системе переноса Т-ДНК.

Таблица 2. Белки процессинга ДНК в различных системах

Семейства ^а <i>nrc</i> -областей	Плаزمид (Inc группа)	Релаксаса	Разрезающий белок ^б	Дополнительные <i>oriT</i> -связывающие белки ^в	Связывающие белки ^г
P	Ti-плазмид	VirD2	VirD1	-	VirD4
P	RP4 (IncP)	Tral	TraJ	TraK	TraG
P	R6K (IncX)	TaxC	TaxA	DDP3	TaxB
P	R64 (IncII)	NikB	NikA	Не опр.	Не известны
F	F (IncFI)	Tral	TraY	TraM	TraD
F	R388 (IncW)	TrwC	TrwA	-	TrwB
F	CloDF13	MobC	MobA	-	MobB
Q	RSF1010 (IncQ)	MobA	-	MobC	

^аСемейства *nrc*-областей соответствуют предложенным классификациям (Lanka, Wilkins, 1995; Pansegrau, Lanka 1996). Недавно охарактеризованная система процессинга *oriT* включает R388 (Llosa et al., 1995; Moncalian et al., 1997), R6K (Avila et al., 1996; Nuflez et al., 1997) и CloDF13 (Nuflez B., Avila P., de la Cruz F., готовится к публикации).

^бБелки, абсолютно необходимые для надрезания сайта (P-семейство) или активирующие разрезание (F-семейство). TraM из плазмиды IncFII-группы RI также усиливает релаксацию (E. Zechner, не опубликовано).

^вБелки, необходимые для функциональной активности транспортной системы, но не для разрезания *nrc*.

^гБелки, связывающие релаксому с транспортным комплексом. Ссылки на специфические белки могут быть найдены в статье: Cabezon et al., 1997.

III. Образование Т-нитей

Процессинг Т-ДНК аналогичен репликации фага jX174 (Komberg et al., 1992). Репликация jX174 происходит путем вытеснения (+)-нити комплексом, сформированным RFI ДНК, фаговым белком grA и хеликазой Rep *E. coli*. Вытеснение происходит сразу после катализируемой grA реакции надрезания в двунитевой области (*dso*) при АТФ-зависимом раскручивании ДНК в присутствии или в отсутствии ДНК-полимеразы. Аналогично, процессинг Т-ДНК (рис. 4) происходит путем вытеснения Т-нити после надреза Т-границ белками VirD1/D2. Область *dso* эквивалентна Т-границам или *nrc*-сайту систем конъюгации (Pansegrau et al., 1996).

Процессинг Т-ДНК катализируется белками VirD1/D2. Мутанты Ti-плазмид по генам *virD1* или *virD2* неспособны к надрезанию по Т-границам (Stachel et al., 1987; Veluthambi et al., 1988). Более того, реакция воспроизводима *in vitro* с использованием очищенных белков VirD1 и VirD2 (Scheiffele et al., 1995). VirD2 производит надрез модельного олигонуклеотида, содержащего последовательности Т-границ (Pansegrau et al., 1993b). Реакция обратима и требует только наличия Mg²⁺. Добавление второго олигонуклеотида приводит к переносу нити, в результате чего образуется гибридная молекула, содержащая 3'-конец одного и 5'-конец другого олигонуклеотида. Сходная реакция показана для grA (jX174). Аналогичная реакция, проходящая как репликация по механизму катящегося кольца на матрице суперспирализованной ДНК, привела бы к формированию одонитевой кольцевой ДНК и регенерации исходной молекулы (рис. 4).

После того, как процессинг Т-ДНК индуцируется ацетосирингоном, секретируемым растением при поранении, индукция *vir*-генов приводит к синтезу Vir-белков и образованию в клетке *Agrobacterium* Т-нитей (однонитевых ДНК) в процессе, предшествующем переносу Т-ДНК в растительную клетку, но независимом от него (Stachel et al., 1986, 1987). Существование одонитевых молекул ДНК как артефактов или побочных продуктов реакции маловероятно, поскольку Т-нити

Плазмиды	Ген	I	II	III	Размер	Название последовательности
R751	TraI	(16-128)	DPAGLAN Y IT	H QHRSV H	(747)	TRI5_ECOLI
RP4	TraI	(16-128)	DFEALVK Y IT	H QHRSV H	(732)	TRI6_ECOLI
R64	NikB	(17-177)	SFEDILVS Y VS	H QHRSV H	(899)	B38529
PTF-FC2	MobA	(20-132)	RVSRLTG Y IR	H QHRSV H	(465)	MOBA_THIFE (1)
PS194	Rlx	(12-113)	SASRAIN Y AE	H QHRSV H	(320)	RLX1_STAAU
PC223	Rlx	(12-113)	STRAIN Y AE	H QHRSV H	(330)	RLX3_STAAU
PC221	Rlx	(12-112)	SASRAIN Y AE	H QHRSV H	(315)	RLX2_STAAU
PTiC58	VirD2	(23-145)	QIINOLE Y LS	H QHRSV H	(447)	VID2_AGR5
PTiA4b	VirD2	(23-145)	QIINOLE Y LS	H QHRSV H	(424)	VID2_AGR6
PTiA6NC	VirD2	(23-145)	QIINOLE Y LS	H QHRSV H	(436)	VID2_AGRRA
R6K	TaxC	(68-184)	GIKNSID Y MS	H QHRSV H	(385)	X95535 (332..1489)
Tn4399	MocB	(10-121)	SFGGVC Y VL	H QHRSV H	(318)	B48487
PLV22a	MbpB	(10-129)	HGVALE Y DL	H QHRSV H	(264)	U25716 (415..1209)
PMV158	Pre	(38-145)	PSRSHLN Y EL	H QHRSV H	(494)	PRE_STRAG
PLB4	PreA	(38-144)	VSRLSHN Y DL	H QHRSV H	(361)	PREA_LACPL
PLAB1000	PreA	(38-144)	VSHSLN Y DL	H QHRSV H	(361)	PREA_LACHI
PUB110	Pre2	(38-144)	HERTREN Y DL	H QHRSV H	(420)	PRE2_STAAU
PTB913	Pre	(38-144)	KERSHEN Y DL	H QHRSV H	(415)	PRE_BACSP
PGI2	PreA	(38-143)	YKSEON Y DL	H QHRSV H	(445)	PREA_BACTU
PE194	Pre1	(39-145)	HEETYN Y DL	H QHRSV H	(403)	PRE1_STAAU
Tn4451	TnpZ	(41-164)	VIEERIP Y NV	H QHRSV H	(421)	U15027 (5028..6293)
R46	TraHI	(11-172)	NVTSVVG Y YS	H QHRSV H	(1078)	U43676 (8..3244)
R100	TraI	(9-169)	SAGSAGN Y YT	H QHRSV H	(1756)	TRI2_ECOLI
F	TraI	(9-169)	SAGSAGN Y YT	H QHRSV H	(1756)	TRI1_ECOLI
R388	TrwC	(11-173)	DIGRAAS Y YE	H QHRSV H	(966)	S43878
PCS101	Mob	(15-135)	SASPHAD Y IA	H QHRSV H	(371)	RLX1_SALTY
RSE1010	MobA	(18-132)	SARAKAD Y IQ	H QHRSV H	(709)	MBA2_ECOLI
PTF1	MobL	(18-167)	SATGAA Y RA	H QHRSV H	(378)	MOBL_THIFE
PIP501	ORF1	(12-139)	SLIINAS Y RS	H QHRSV H	(654)	U39769 (1415..3379)
PGO1	Nes	(18-143)	SATAKSA Y NS	H QHRSV H	(665)	U50629 (214..2211)
PTiC58	TraA	(18-154)	SVLSAA Y QH	H QHRSV H	(1101)	U40389 (3239..6544)
PTiR10	TraA	(18-154)	SVLSAA Y RH	H QHRSV H	(1100)	U43674 (7977..11279)
PNGR234a	TraA	(18-154)	SAVLSAA Y RH	H QHRSV H	(1102)	TRAA_RHISN

Рисунок 2. Релаксаза VirD2 принадлежит к суперсемейству Mob RCR-белков репликации (Panssegrau et al., 1991; Ilyina et al., 1992). Четыре семейства белков показаны в четырех блоках. Они соответствуют четырем семействам *nic*-сайтов, показанных на рисунке 3. Существует и пятое семейство (ColEI), для которого не описано консервативности выделенного домена. На рисунке показаны три мотива аминокислотных последовательностей, консервативных в суперсемействе Mob, и объединены четыре консервативных аминокислоты: тирозин, который связывается ковалентно с 5'-концом *nic*-сайта и три тистидина, возможно, вовлеченные в координацию иона Mg^{2+} . В последней колонке приведены названия белков из баз данных (SwissProt или PIR), если они имеются, или ДНК (по GenBank), включая в этом случае координаты трансляции.

образуются в количестве одной молекулы на бактериальную клетку (Stachel et al., 1986). Таким образом, синтез Vir-белков непосредственно приводит к процессингу Т-ДНК с образованием свободных Т-нитей в клетке *Agrobacterium*. С другой стороны, *in vitro* белки VirD1/D2 катализируют реакцию разрезания границ суперспирализованной ДНК, для детекции разрезов необходим денатурирующий агент, как и при конъюгативном переносе.

Реакция, опосредуемая VirD2, имеет интересную особенность: специфичность фермента по отношению к олигонуклеотидной последовательности заметно ниже, чем у конъюгативных релаксаз. Последние очень специфичны к последовательностям своих *nic*-сайтов (Pansegrau et al., 1993a; Llosa et al., 1996), а белок VirD2 может использовать как олигонуклеотиды, специфичные для RP4, как и последовательности Т-границ (Pansegrau et al., 1993b). Этот результат был интерпретирован как приспособленность фермента к последующему случайному встраиванию Т-ДНК в растительную хромосому. Однако последние данные свидетельствуют против участия VirD2 во встраивании Т-ДНК в хромосому растения: оказалось, что интеграция определяется хозяином. В растении она осуществляется, главным образом, за счет незаконной рекомбинации, а у дрожжей может происходить как гомологичная, так и незаконная рекомбинация, в зависимости от уровня гомологии между Т-ДНК и дрожжевой хромосомой (Bundock et al., 1995, 1996). Даже если VirD2 вовлечен в выбор мишени, очевидно, что незаконная рекомбинация, которая происходит при интеграции, проходит по иному сценарию, нежели вырезание и транспорт Т-нити (Tinland et al., 1995).

В то же время, мы полагаем, что уменьшение специфичности реакции разрезания под действием VirD2 может приводить к ослаблению его сродства к 3'-концу *nic*-сайта, и может быть интерпретировано как направленность реакций процессинга на два результата. Во-первых, реципиенту необходимо, чтобы VirD2 ослаблял взаимодействие с 3'-концом Т-нити донора, поскольку в донорных клетках найдена одонитевая линейная ДНК. Это может быть достигнуто, если сродство VirD2 к 3'-концу слабее по сравнению с TraI из RP4. Во-вторых, как видно из рисунка 4, ослабление "зажима" на 3'-концах в случае обоих — первой (на RB) и второй (на LB) молекул VirD2, позволяет первой молекуле VirD2 покинуть комплекс после деспирализации, с образованием Т-нити и свободного 3'-конца. Если это происходит, то между процессами переноса Т-ДНК и конъюгации на этом этапе существуют значительные различия.

Другой важный факт состоит в переносе только последовательности между RB и LB, тогда как при конъюгации переносится целая плаزمиды. Но это только поверхностное различие. Показано, что плазмиды, содержащие два прямых повтора *ori-Ts*, могут переносить сегмент ДНК, находящийся между ними (Enckson et al., 1993). С другой стороны, конструкции, полученные на основе Ti-плазмид, часто переносятся в растения полностью (van der Graaff et al., 1996). Кроме того, Ti-плазмиды с RB в противоположной ориентации могут переносить большую часть ДНК плазмиды (Miranda et al., 1992). Существует несколько мнений относительно того, в какой форме ДНК переносится в растение, поскольку линейная двунитевая Т-ДНК обнаружена также и в клетках *Agrobacterium*. Однако накапливающиеся факты показывают, что перенос одонитевой ДНК наиболее вероятен (Tinland et al., 1995).

IV. Активация Т-нитей

IV.A. ПЕРЕНОС Т-ДНК И БАКТЕРИАЛЬНАЯ КОНЪЮГАЦИЯ МОГУТ ИСПОЛЬЗОВАТЬ РАЗЛИЧНЫЕ СТРАТЕГИИ ДЛЯ ПРОЦЕССИНГА Т-ДНК

Как уже было сказано, Vir-белки после активации могут процессировать Т-ДНК до свободных Т-нитей. С другой стороны, собранные *in vitro* конъюгативные релаксосомы не способны к деспирализации, поскольку отрезанный 3'-конец тесно связан с релаксазой и не доступен для ДНК-полимеразы (Willets et al., 1984; Pansegrau et al., 1990; Schermger et al., 1992). На сегодняшний день не известен реагент, который мог бы перевести релаксосому в репликативный комплекс. Наблюдаемый релаксосомный "зажим" можно объяснить как следствие высокого сродства 3'-конца *nic*-сайта к релаксазе (Pansegrau et al., 1996).

1	RP4	T T C A C C T A T C C T G/C C C G G C
	R751	T T C A C A C A T C C T G/C C C G C C
	pTF-FC2	A A C G G T C A T C C T G T A T T G C
	R64	A T T G C A C A T C C T G/T C C C G T
	pTiC58 LB	A C A A T A T A T C C T G/C C A C C A
	pTiC58 RB	C C A A T A T A T C C T G/T C A A A C
	R6K (α)	T T G C C C T A T C C T G C A T C G C
	R6K (β)	T T G C C C T A T C C T G C A T C G C
	Tn4399	C G A C A T T A A C T T/G C T A T C C
2	pMV158	A A A G T A T A G T G T G/T T A T A C
	pIP823	A A A G T A T A G T G T G C T A T A C
	pTB913	A A A G T A T A G G T G C T T A T A C
	pLAB1000	A A A G T A T A G T G G G T T A T A C
	pCI411	A A A G T A T A G T G A G T T A T A C
	pT181	T A A G T C T A G - G T G T T A G A C
	pE194	T A A G T C T A G T G T G T T A G A C
	pVA380-1	A A A G G C T A G T A C G T T A C A C
	pTA1015	T T G G T G T A G T - C G T T A C A C
	pTA1060	T T G G T G T A G T G C G T T A C A C
3	F	T T T G C G T G G G G T G T G G T G C
	P307	T T T G C G T A G G G T G T G G T G C
	R100	T T T G C G T A G T G T G T G G T G C
	pED208	T T T G C G A C G G G T G T G G G A C
	CloDF13	T G G A T T T T G T G G G T G G T C G
	R46	G C T G C G T T A G G T G T A T A G C
	R388	G G T G C G T A T T G T C T A T A G C
4	RSF1010	A C C G G T A A G T G C G C C C T C C
	R1162	A C C G G T A A A T G C G C C C T C C
	pTF1	T A C T C T A A G T G C G C C C T T G
	pTiC58 oriT	A C G T A T A A T T G C G C C C T T G
	pSC101	A A G T C T A A G T G C G C C C T G A
	pIP501	G C G T A T A A G T G C G C C C T T A
	pG01	T C G C A T A A G A G C G C C C T T A
5	ColE1	G G A G T G T A T A C T G G C T T A A
	ColA	G G A G T G T A T A C T G G C T T A C

КОНСЕНСУС

- - - G - - T A G t G T G T c - T - C

Рисунок 3. T-границы Ti-плазмид относятся к классу RP4 ориджинов конъюгативного транспорта. На рисунке показаны последовательности, распознаваемые пятью классами белков из суперсемейства Mob; остатки, идентичные предполагаемому консенсусу, обведены. Ссылки даны в подписях к таблице 2. Недавно охарактеризованные *oriT* последовательности: Tn399 (Murphy et al., 1995), Group 2 (Guzman et al., 1997) и pG01 (Chimo et al., 1996).

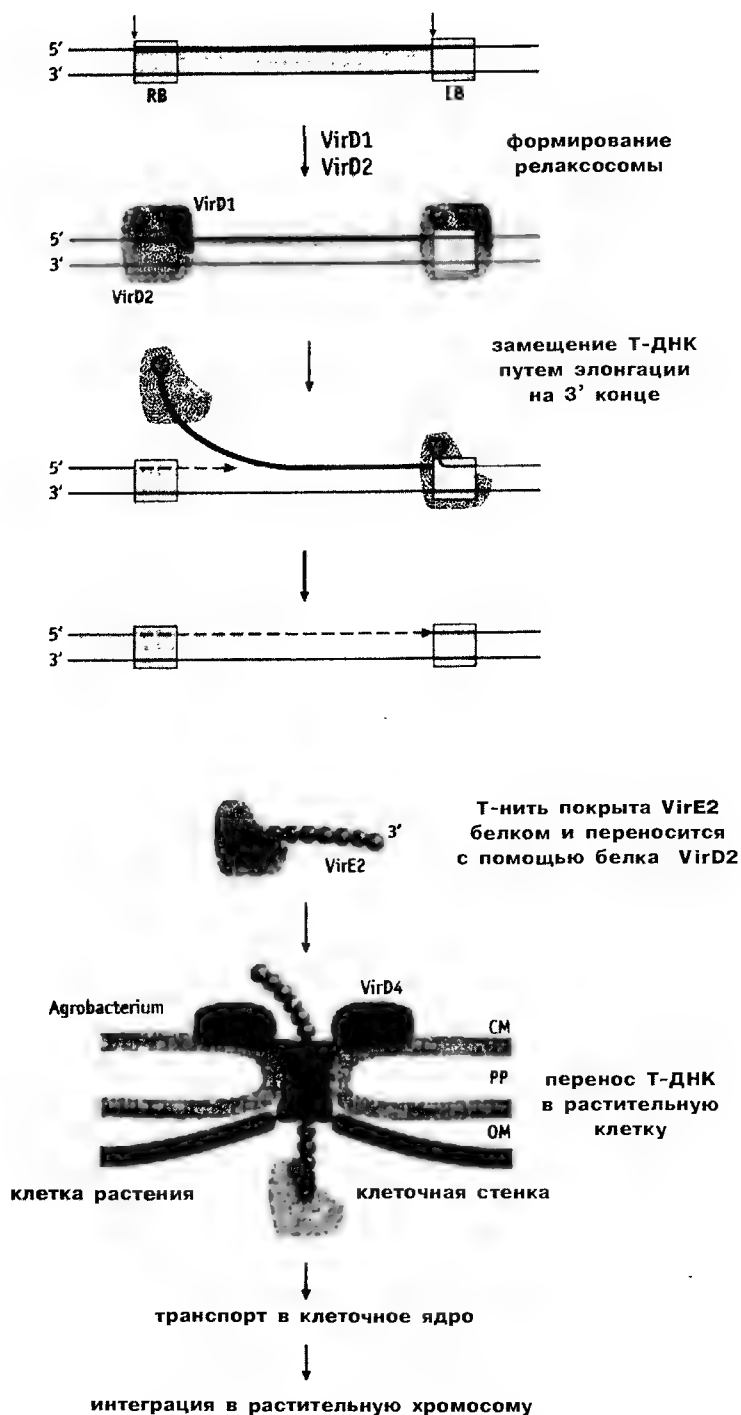


Рисунок 4. Схема процессинга Т-нити. 1) За формированием релаксомы посредством белков VirD1/D2 следует обратимое разрезание в областях обоих RB и LB; 2) ослабление 3'-зажима RB, репликация с вытеснением нити, с использованием 3'-конца как праймера; вытесняемая нить постепенно покрывается белком VirE2; 3) второе разрезание по LB и освобождение Т-нити, связанной с VirD2, 4) нуклеопротеиновый комплекс (Т-комплекс) формируется из Т-ДНК, покрытой VirE2, направляется VirD2, ведется при помощи VirD4 к месту транспорта и переносится в растительную клетку системой переноса Т-ДНК.

Конъюгативные плазмиды могут быть исходно репрессированы в отношении транспорта ДНК, что характерно для R100 и R6K, или дерепрессированы, как F, RP4 и R388. У дерепрессированных плазмид конъюгация происходит конститутивно, в то время как у репрессированных плазмид она идет с низкой частотой из-за случайного освобождения от репрессии или временной дерепрессии, посредством первого спаривания, распространяющейся эпидемически среди реципиентов. Имеющиеся данные говорят о том, что перед вовлечением донорных клеток в конъюгацию релаксосомы пре-ассоциированы, независимо от уровня репрессии *tra*-генов. Это показано для плазмид RP4 (Pansegrau et al., 1993a), F (Shennan et al., 1994) и R6K (Avila et al., 1996), поскольку отрицательно суперспирализованная ДНК может быть изолирована из релаксосом в отсутствии реципиента (Furst et al., 1989).

Интересен тот факт, что плаزمид R6K содержится приблизительно в 20 копиях на клетку, и тем не менее большинство молекул представлены в форме релаксосом, несмотря на исходную репрессию. У R6K *drdI*, конъюгативно дерепрессированного мутанта штамма R6K, перенос осуществляется с частотой в 1000 раз выше, чем у исходного штамма. Тем не менее, в клетках мутанта большая часть плазмидных молекул находится в состоянии пре-ассоциированных релаксосом (Avila et al., 1996). Поскольку число релаксосом не связано с частотой конъюгации, можно считать, что их формирование предшествует инициации конъюгации. Следовательно, активация конъюгативного процессинга ДНК происходит сразу после контакта бактерий с реципиентом и после активации релаксосом. Можно считать, что сигнал спаривания запускает конъюгацию путем ослабления релаксосомного "зажима" и разрешения деспирализации ДНК и последующего транспорта Т-нити.

Перенос Т-ДНК Ti-плазмид, вероятно, может пролить свет на эту проблему. Стартовая ситуация у них может быть другой: *vir*-гены являются субъектами репрессии, а Т-границы свободны от релаксосом. Это значит, что для индукции необходимы надрезы границ или одинарные Т-нити (de la Cruz et al., 1986; Stachel et al., 1987). Будучи однажды индуцированными, Vir-белки способны процессировать Т-ДНК до стадии свободных Т-нитей, обходя таким образом, "релаксосомный зажим". С другой стороны, Vir-система способна индуцировать конъюгацию (и перенос в растения) RSF1010, так что какими бы ни были различия в процессинге ДНК, релаксосомы RSF1010, образуемые Mob-белками из RSF1010, могут быть задействованы транспортной Vir-системой. Этот важный факт показывает, что соответствующие комплексы, в принципе, не могут быть различными, поскольку распознаются одним и тем же триггером. Кроме того, Т-нити не секретируются в среду системой Т-переноса *Agrobacterium* (Stachel et al., 1986). Таким образом, даже предсуществующие Т-нити должны быть активированы для транспорта. Мы полагаем, что триггер для переноса ДНК действует после синтеза Т-нитей. Можно ли представить, что один и тот же триггер действует и в случае релаксосом RSF1010 и в случае VirD2/VirD1? Он может быть, скорее всего, сигналом, который передается от аппарата формирования пар к релаксосомам различных типов. Таким образом, триггер, по-видимому, действует как посредник, взаимодействующий с релаксосомами и системой Mpf. В этих представлениях центральное место отводится белку VirD4.

IV.B. VIRD4 КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МОТОР И ВЕРОЯТНЫЙ ПЕРЕДАТЧИК СИГНАЛА СПАРИВАНИЯ

Белок VirD4 необходим для транспорта ДНК в растительные клетки (Koukolikova-Nicola et al., 1993). Согласно данным опытов по иммулокализации, VirD4 находится в цитоплазматической мембране. Однако функциональный анализ показал его присутствие во внутренней мембране и в промежуточной фракции, что говорит о возможности связывания и с внешней мембраной (Okamoto et al., 1991). Те же авторы сконструировали серию гибридных белков ("слияний") со щелочной фосфатазой PhoA для того, чтобы показать, что только слияния в области с 30 по 41 аминокислотный остаток приводит к фенотипу PhoA⁺, и, следовательно, этот домен лежит в периплазме. Этот факт вместе с указанием на наличие двух α -спиральных трансмембранных доме-

нов у VirD4 наводит на мысль о том, что VirD4 — это двувёршинный мембранный белок, пронизывающий внутреннюю мембрану дважды и лежащий N- и C-концами в цитоплазме.

VirD4 относится к классу TraG-подобных белков. Эти крупные (50-70 кД) белки охарактеризованы по аминокислотным последовательностям и функциональному сходству (Ziegelin et al., 1991; Lessl et al., 1992; Balzer et al., 1994). TraG-подобные белки конъюгативных плазмид являются существенными компонентами транспортного аппарата. TraG-подобные белки, как и VirD4, связаны с цитоплазматической мембраной (Okamoto et al., 1991; Panicker et al., 1992). В их последовательностях присутствуют более или менее консервативные нуклеотид-связывающие мотивы типа А и В, трансмембранные и амфифильные спиральные сегменты. В случае белка TraG, кодируемого плазмидой RP4, важность нуклеотид-связывающего домена для функционирования белка доказана путем сайт-специфического мутагенеза (Balzer et al., 1994). Замещение определенных остатков этих доменов инактивирует TraG, подтверждая их значимость. Только в случае F-плазмиды для белка TraD имеются предварительные доказательства связывания с ДНК (Panicker et al., 1992).

Первые опыты показали, что TraD, гомолог TraG из плазмиды F, действует на поздних стадиях конъюгации, поскольку мутации в *traD* приводят к частичному дефекту в заместительном синтезе нити в донорной клетке (Kingsman et al., 1978). Он не требовался ни для образования пилей, ни для процессинга посредством релаксасом, а был напрямую вовлечен в транспорт ДНК. Таким образом, TraD считался ключевым ферментом в транспорте ДНК и возможным молекулярным мотором переноса. Хотя прямых доказательств этой функции нет, косвенные доказательства согласуются с данной гипотезой. Из генетических и биохимических данных был сделан вывод о том, что TraG и его аналоги взаимодействуют с релаксасомой, возможно посредством белок-белковых взаимодействий с релаксазой (Waters et al., 1992; Lessl et al., 1993; Balzer et al., 1994; Cabezon et al., 1994; Pansegrau et al., 1996; Cabezon et al., 1997). Однако TraG-подобные белки не требуются для надрезания ДНК или формирования переносимой нити Т-ДНК (Stachel et al., 1987). Как правило, TraG-подобные белки не требуются и для образования пилей, но они необходимы для мобилизации мелких, не переносимых самостоятельно плазмид конъюгативными хелперными плазмидами. Исключением является белок VirD4, присутствие которого необходимо как для переноса RSF1010 в растительные клетки, так и для синтеза или сборки Vir-пилей (Fullner et al., 1996). Анализ последовательности пока не дает объяснения этому наблюдению. Однако возможно, что VirD4 включает активность, которую обычно выполняет система сборки пилей. В случае Vir-системы она может быть связана с VirD4 (Haase et al., 1997).

TraG-подобные белки найдены только в системах транспорта ДНК, но не в системах экспорта белков, таких как родственная VirB система Ptl из *B. pertussis*, ответственная за выделение токсина (Weiss et al., 1993). Таким образом, заманчиво предположить, что TraG-подобные белки обеспечивают превращение (адаптацию) системы транспорта белков в систему транспорта ДНК и белков. Обнаружение того, что *H. pylori* имеет закодированный в хромосоме аналог TraG, может пролить свет на эту проблему. Интересно понять, принадлежит ли белок, кодируемый областью вирулентности *cag H. pylori*, к системе конъюгативного переноса или является ее рудиментом (Censini et al., 1996).

V. VirB - транспортная структура

V.A. КАКОВА ФУНКЦИЯ КОМПЛЕКСА VIRB В ПЕРЕНОСЕ Т-ДНК ИЗ *AGROBACTERIUM*?

В этой области больше вопросов, чем ответов. Важен вопрос о молекулярных различиях между так называемыми жидкостными и поверхностными конъюгантами. Плазмиды IncN, P или W, имеющие наибольшее сходство с VirB (рис. 1), являются поверхностными конъюгантами. Клетки, содержащие эти плазмиды, конъюгируют гораздо лучше на полутвердой, чем в жидкой среде. Эта особенность коррелирует с образованием толстых жестких пилей. С другой стороны, данные о функции пилей в процессе конъюгации получены, главным образом, при изучении F-

системы. Поскольку F-содержащие клетки образуют тонкие гибкие пили и лучше конъюгируют в жидкой, чем на полутвердой среде, наблюдения над плазмидой F могут быть бесполезными при изучении переноса плазмид, осуществляющемся с большей частотой на полутвердых поверхностях. Данная точка зрения подтверждается и для R64. Эта крупная IncII плаزمида переносится в жидкости также, как и на твердой поверхности. Она контролирует образование двух типов пилей: тонких, необходимых для спаривания в жидкости, и толстых жестких, необходимых как на твердой поверхности, так и в жидкости (Kim et al., 1997). Таким образом, конъюгация в жидкой фазе - это эволюционное приобретение некоторых плазмидных систем. Возможно, не весь набор генов R64, необходимых для конъюгации в жидкой среде, вовлечен в транспорт ДНК.

После того, как стало ясно, что VirB-белки структурно и функционально аналогичны системе формирования пар у конъюгативных плазмид, образующих жесткие пили, "охота" за пилиями агробактерий стала весьма актуальной (Kado, 1994; Winans et al., 1996). Было обнаружено, что образование пилей зависит от каждого из белков VirB (Fullner et al., 1996). Присутствие VirD4 необходимо для синтеза VirG-зависимых пилей. Таким образом, обнаруженные пили, вероятно, участвуют в конъюгации (Fullner et al., 1996). Но каким бы ясным и важным ни было это открытие, оно не помогло ответить на вопрос о механизме транспорта T-ДНК. Причина заключается в том, что спор о роли конъюгативных пилей в бактериальной конъюгации далек от завершения (Dreiseiklmann, 1994; Haase et al., 1995; Firth et al., 1996; Silverman, 1997). Во-первых, ДНК не обнаружена в конъюгативных пилиях после их изоляции (Frost et al., 1991). Во-вторых, пили втягиваются до начала транспорта ДНК, так что обычно мембраны конъюгирующих клеток соприкасаются (Duttenberger et al., 1991). Возникает вопрос о том, является ли аппарат сборки и выпячивания пилей составной частью поры для переноса ДНК. В-третьих, остается непонятным отсутствие связи между наличием у RP4 Trb-зависимых внеклеточных филаментных структур и способностью к транспорту T-ДНК (Haase et al., 1995).

Эти результаты, ставящие под сомнение участие пилей в транспорте ДНК, были нейтрализованы сообщением о том, что плазмиды F при конъюгативном переносе могут передаваться через протяженные пили (Harrington et al., 1990). Однако представление этих результатов на конференции (Schloss Ringberg, Germany, 1991) вызвало большие споры (эта работа не была продолжена, так что существуют сомнения относительно истинного значения проведенных опытов). Суммируя имеющиеся данные, можно сделать вывод о том, что белки VirB необходимы для синтеза пилей. Непосредственное участие этих белков в транспорте ДНК остается неясным, поскольку не было представлено данных, позволяющих обсуждать этот вопрос. Вероятная функция VirG-зависимых пилей является такой же, как и в случае конъюгативных плазмид. Во-первых, бактериальная конъюгация может походить на филаментную фаговую инфекцию, переносящую нить ДНК через люмен пилеподобного "моста" (Harrington et al., 1990). При этом перенос ДНК может происходить после втягивания пилей посредством аппарата их сборки, то есть базальной пластинки пилей. Во-вторых, пили могут действовать только как «крюки», соединяющие конъюгирующие клетки так, чтобы было осуществлен конъюгативный контакт (Duttenberger et al., 1991). В-третьих, пили могут принимать участие в передаче сигнала спаривания релаксосоме, таким образом запуская конъюгацию. Эти три функции (образование "моста", стягивание клеток и восприятие сигнала) не являются взаимоисключающими, по нашему мнению, они могут выполняться белками VirB и аналогичными мульти-белковыми аппаратами конъюгативных плазмид.

V.V. КОМПОНЕНТЫ КОМПЛЕКСА VIRB

В течение ряда лет большая часть работ по изучению белков VirB была нацелена на получение материалов (мутанты, белки, антибиотики), которые могут помочь выяснению функции белков VirB. Например, были сконструированы делеции в каждом из 11 генов *virB*, что позволило изучить их индивидуальный вклад в процесс переноса (Berger et al., 1993). Белки VirB2...VirB11 оказались необходимыми составляющими транспортного аппарата, в то время как мутации в VirB1 уменьшали вирулентность приблизительно в 100 раз, показывая, что определенные растительные компоненты могут замещать данный белок, или что этот белок функционирует только как оптими-

Таблица 3. Доказанные и/или предполагаемые свойства белков VirB

Белок	A/K ¹	Сигнальная последовательность ²	ТМ сегменты ³	Ферментативная активность ⁴	Клеточная локализация ⁵	Ссылки
VirB1	239	тип II (экспериментально)	нет	лизосим?	Внутренняя мембрана; PhoA+	Thorstenson et al., 1993
VirB2	121	тип I (экспериментально)	2	пилин?	Внутренняя и наружная мембрана; PhoA+	Fullner et al., 1996b; Jones et al., 1996; Shirasu et al., 1993
VirB3	108	нет	1 (длинный)	-	Наружная мембрана; PhoA-	Shirasu et al., 1993; Jones et al., 1994
VirB4	789	нет	нет	АТФ-аза, стабилизация VirB3	Внутренняя мембрана; PhoA-/PhoA+ K-/K+	Thorstenson et al., 1993; Dang et al., 1997; Fullner et al., 1994; Shirasu et al., 1994
VirB5	220	тип I	нет?	-	Периплазма, PhoA+, K+	Anderson et al., 1996; Baron et al., 1997b; Fernandez et al., 1996a; Fernandez et al., 1996b; Spudich et al., 1996
VirB6	295	нет	5-6	-	Внутренняя мембрана, PhoA+	
VirB7	55	тип II	нет	Стабилизация VirB4/9/10/11, комплекс B7/B9	Наружная мембрана, обращен в периплазму, PhoA+	Thorstenson et al., 1993, 1994
VirB8	237	тип I?	1	-	Внутренняя и наружная мембрана; PhoA-, K+	См. VirB7; Shirasu et al., 1993, Thorstenson et al., 1993
VirB9	293	тип I	нет	комплекс B7/B9, B9/B10/B11?	Внутренняя и наружная мембрана; PhoA-, K+	Thorstenson et al., 1993; Beaupre et al., 1997; Ward et al., 1990
VirB10	377	нет	1	Комплекс B9/B10/B11?	Внутренняя и наружная мембрана; PhoA+, K+	Christie et al., 1989; Thorstenson et al., 1993; Rashkova et al., 1997; Stephens et al., 1995
VirB11	343	нет	нет	АТФаза?, комплекс B9/B10/B11?	Внутр.М; PhoA-, K-	

¹размер непроцессированной формы (в аминокислотных остатках)²разрезание сигнальными пептидазами (липопротеин) типа I или II предсказано или экспериментально определено.³определено по алгоритму (Klein et al., 1985), для α-спиральных трансмембранных сегментов.⁴Комплекс VirB7/B9 описан ранее (Anderson et al., 1996; Spudich et al., 1996; Baron et al., 1997b). Возможный комплекс VirB9/B10/B11 описан ранее (Finberg et al., 1995).⁵Вестерн-анализ изолированных клеточных фракций, проведенный ранее (Shirasu et al., 1993; Thorstenson et al., 1993). TnPhoA сшивки описаны в работе Beijersbergen et al., 1994. PhoA⁺ = обнаружена активная сшивка; PhoA⁻ = не обнаружено активной сшивки. Восприимчивость к протеиназе К изучена на бактериальных сферопластах.

зирующий фактор. Имеются данные о физическом взаимодействии в пределах группы VirB-белков. Кроме того, делеции некоторых *virB*-генов приводят к редукции нормальных уровней других VirB-белков, что говорит о том, что физические взаимодействия способствуют сборке или стабилизации соседних белков (Jones et al., 1994; Berger et al., 1994; Fernandez et al., 1996a). Наконец, белки VirB были локализованы в различных компартментах бактериальной клетки с использовани-

ем комбинации разных методик, таких как чувствительность к протеиназе К, Вестерн-гибридизация белков мембранной фракции, активность фосфатазы в трансляционных сшивках (табл. 3). Все эти данные говорят о существовании пронизывающего мембрану комплекса, состоящего из белков VirB.

Интригующий вопрос, на который необходимо ответить, состоит в том, достаточно ли сильно взаимодействуют компоненты комплекса для того, чтобы их было возможно изолировать вместе. Данные литературы позволяют делать предварительные выводы о вкладе отдельных белков в до сих пор гипотетический комплекс VirB.

VirB1 представляет собой белок размером 28 кДа, содержащий N-концевую сигнальную последовательность, но не имеющий выраженных трансмембранных сегментов. Сигнальный пептид удаляется кодируемым хромосомой Sec-аппаратом с образованием белка размером 27 кД. Согласно данным о локализации, это приводит к образованию формы, связанной с внутренней мембраной. Последующий процессинг (после аминокислотного остатка 179) приводит к образованию секретируемой формы белка, которая может быть очищена (Baron et al., 1997a). N-концевая часть сходна с лизоцим-подобным белком (β -1,4-глюкозидазой), о чем судят по сходству с лизоцимом белка куриного яйца (Bayer et al., 1995; Mushegian et al., 1996). Мутации каталитических аминокислот приводили к отсутствию вирулентности (Mushegian et al., 1996). Очевидно, что такие точковые мутации полностью нарушают работу белка. Сходный эффект дает делеция гена *virB1* (Berger et al., 1994). Все это наводит на мысль о том, что N-концевой домен VirB1 локально разрушает некоторые полисахариды оболочки в месте проникновения Т-ДНК, что делает возможным формирование поры для ее переноса. Процессурируемая С-концевая часть функционирует на клеточной поверхности и может взаимодействовать с растительной клеткой. Важно, что VirB1 взаимодействует с комплексом VirB7/B9 (Baron et al., 1997a).

VirB2. Белок размером 12,3 кД, структура которого предсказана исходя из последовательности ДНК, превращается в белок 7,2 кД под действием клеточной сигнальной пептидазы. Процессинг осуществляется в *Agrobacterium* и в *E. coli* в отсутствие Vir-белков. Процессированный белок связан с внутренней бактериальной мембраной (Jones et al., 1996). Обе формы — процессированная и предшественник — гидрофобны, что показал анализ их аминокислотных последовательностей. VirB2 аналогичен TraA, главному структурному элементу F-пилий, поэтому он является наиболее вероятным кандидатом на роль пилина (Shirasu et al., 1993; Jones et al., 1996). Действительно, когда были выявлены Vir-зависимые пили *Agrobacterium*, VirB2 считался одним из возможных кандидатов на роль основного структурного белка (Fullner et al., 1996). Пилин F-подобных плазмид играет центральную роль в конъюгации, поэтому он был объектом пристального внимания (Firth et al., 1996; Silverman, 1997). Если VirB2 действительно сходен с F-пилином и функционирует при контакте с растительной клеткой, очень важно сравнение этих систем. Структура, синтез и топология субъединиц F-пилий, также как и сборка филаментов F-пилий рассмотрены в обзорах (Firth et al., 1996; Silverman, 1997). Используя структурную информацию об F-пилях (Paiva et al., 1996), мы сравнили последовательности пилинов, что показано на рисунке 5. Оказалось, что VirB2 имеет ту же структурную организацию, что и предполагаемые конъюгативные пилины. Их аминокислотные последовательности и предсказанные вторичные структуры являются практически полностью α -спиральными, с двумя крупными гидрофобными α -спиралями, пересекающими бактериальную мембрану. N-конец зрелого белка обращен в периплазму, короткая консервативная петля находится в цитоплазме. Может быть важным то, что конъюгативные пили RP4 и Ti плазмиды содержат С-концевое продолжение, которого нет в остальных пилинах. Эта часть белка отрезается в TraF-катализируемом процессе созревания (Haase et al., 1997).

VirB3. Синтезируясь вместе с остальными VirB белками, VirB3 локализуется, главным образом во внешней мембране. Однако его синтез и стабильность зависят от коэкспрессии VirB4. Белок VirB3 не имеет типичной сигнальной последовательности, и содержит одну трансмембранную α -спираль. Теоретически он должен присутствовать во внутренней мембране. В действительности, это обнаружено в отсутствие, но не в присутствии VirB4. Таким образом, VirB4 стабилизирует VirB3 и переносит его на внешнюю мембрану (Jones et al., 1994).

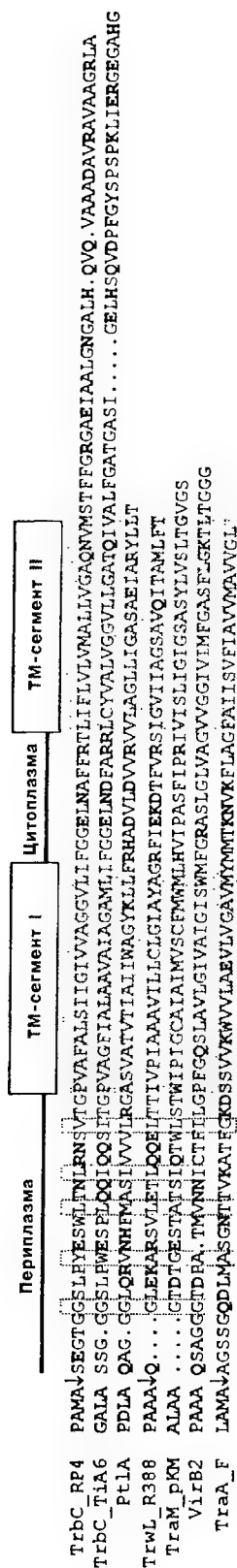


Рисунок 5. Структурная организация N-терминально-процессируемых форм предполагаемых конъюгативных пилинов. Последовательности выровнены вручную, согласно экспериментально определенным сайтам разрезания (вертикальные указатели, R388 TrwL (Bolland, 1992), F TraA (Raiva et al., 1996), RP4 TrbC (Lessl et al., 1992; Haase et al., 1997). Элементы вторичной структуры F пилина взяты из: Raiva et al., 1992. Потенциальная периплазматическая α-спираль представлена остатками, формирующими неполярную сторону (точечные рамки). Два трансмембранных α-спиральных сегмента изображены на затененном фоне. Сильно полярные остатки выделены жирным шрифтом. TraA из F, TrwL из R388 и TrbC из RP4 являются объектами N-концевого процессинга сигнальной пептидазой Ler *E. coli* (Haase et al., 1997). Дополнительный C-концевой процессинг TrbC посредством пептидазы, кодируемой хромосомой, и TraF приводит к образованию зрелого белка размером около 7 кД, который соответствует размеру других перечисленных белков. TraF функционирует как специфическая протеаза RP4. Аналог TraF из T1 плазмиды был найден по сходству последовательности. Он известен как Otr2 и картируется рядом с локусом *virF* (Farand et al., 1996).

VirB4. Это самый крупный из белков VirB (84 кД). Хотя данный белок лишен трансмембранных сегментов, он постоянно локализован во внутренней мембране за счет взаимодействия с другими интегральными белками, или непосредственно взаимодействуя с мембраной посредством других структур, таких как β -складчатости. Опыты с использованием трансляционных сшивок и чувствительности к протеазе позволили прояснить топологию VirB4: это интегральный белок внутренней мембраны с двумя короткими периплазматическими сегментами (Dang et al., 1997). Белок, очищенный от тел включения, имеет АТФ-азную активность (Shirasu et al., 1994). В других работах отмечалась функциональная важность нуклеотид-связывающего домена (Berger et al., 1993; Fullner et al., 1994). Показано, что мутации инвариантного лизина в трансмембранном домене А, который определяет конфигурацию АТФ-связывающего сайта, приводят к доминантному негативному фенотипу. Этот результат показывает, что VirB4 работает в составе ДНК-транспортного комплекса (Fullner et al., 1994).

VirB5. Согласно аминокислотной последовательности, VirB5 содержит сигнальный домен и один трансмембранный сегмент. Он локализован в цитоплазматической мембране и цитоплазме (Thorstenson et al., 1993). Однако последовательность VirB5 сходна с TgaC плазмиды pKM101 (Pohlman et al., 1994). Поскольку мутанты по гену *traC* можно комплементировать внеклеточно (Winans et al., 1985), очевидно, что белок VirB5 может собираться на внеклеточной стороне мембраны или действовать в реципиентной клетке.

VirB6. Как и VirB2, это сильно гидрофобный белок, имеющий шесть потенциальных трансмембранных сегментов, но не имеющий сигнальной последовательности. По-видимому, он локализован в цитоплазматической мембране (табл. 3).

VirB7. Это самый маленький белок, кодируемый опероном (4,5 кД), но, вероятно, наиболее полно изученный. Он представляет собой связанный с внешней мембраной липопротеин, обращенный в сторону периплазматической поверхности (Fernandez et al., 1996b). VirB7 взаимодействует и стабилизирует VirB4, VirB9, VirB10 и VirB11 (Fernandez et al., 1996a). Взаимодействие с VirB9 доказано тем, что они образуют изолируемый белковый комплекс, связанный дисульфидными связями (Anderson et al., 1996; Baron et al., 1997b; Spudich et al., 1997). VirB7 у *A. tumefaciens* может быть помечен (³H)-пальмитиновой кислотой, что доказывает его липопротеиновую природу (Baron et al., 1997b). Остатки жирных кислот могут быть ответственны за мембранную локализацию белка.

VirB8 локализован в цитоплазматической мембране, что было предсказано по отсутствию сигнальной последовательности и наличию трансмембранного сегмента, а затем доказано методом электронной микроскопии и при помощи сшивок с TnpA (табл. 3). Ранее с помощью метода фракционирования клеток VirB8 был локализован в цитоплазматической и внешней мембранах, вместе с VirB9 и VirB10 (Thorstenson et al., 1994).

VirB9 имеет сигнальную последовательность, но не имеет трансмембранных сегментов. Он взаимодействует только с VirB7. VirB9, будучи стабилизированным посредством VirB7, ответственен за формирование комплексов высокого молекулярного веса, возможно, олигомеров VirB10 (Beaupre et al., 1997).

VirB10. Имеет размер 48 кД, одну трансмембранную спираль и не имеет сигнальных последовательностей. Он локализован как интегральный белок внутренней мембраны. Способен формировать агрегаты большого молекулярного веса (Ward et al., 1990) в процессе, который зависит от VirB9. VirB10 имеет (теоретически) $pI=5,4$, что может объяснить его низкую подвижность в SDS-полиакриламидном геле.

VirB11 был первоначально охарактеризован как белок, имеющий АТФ-азную активность и способный к автофосфорилированию (Christie et al., 1989). Однако затем оказалось, что это не так: данному белку не может быть приписано ни АТФ-связывающей, ни гидролитической активностей (Stephens et al., 1995). Позднее авторы использовали растворимую фракцию N-концевой сшивки VirB11 с мальтозосвязывающим белком с целью определить ферментативную активность *in vitro*. Хотя белковая сшивка могла комплементировать мутацию *virB11 in vivo*, АТФ-азной или автофосфорилирующей активностей обнаружено не было. Однако когда инвариантный Lys в потенциальном трансмембранном домене А был мутагенизирован, возникшие белки были неактивны *in*

in vivo и генетически рецессивны по отношению к дикому типу. Таким образом, АТФ-связывающий сайт, вероятно, является существенным для функциональной активности белка. Это противоречие может быть связано с тем, что 70% VirB11 контактирует с цитоплазматической поверхностью внутренней мембраны, а 30% остается в растворимой фракции (Rashkova et al., 1997). Аналогичные данные получены независимо от присутствия других VirB-белков, что удивительно, поскольку описано влияние мутаций в гене *virB7* на стабильность VirB11. Связанная с мембраной фракция только частично растворима мочевиной. Эти и другие данные говорят о динамическом взаимодействии VirB11 с бактериальной мембраной, где центральную роль играет связывание (гидролиз) нуклеотидтрифосфата. Если это так, то растворимая фракция может быть лишена нуклеозид трифосфатазо-связывающей, или гидролитической активности (Stephens et al., 1995), а другая фракция имеет эти активности (Christie et al., 1989). N- и C-концевые части белка могут взаимодействовать с мембраной независимо (Rashkova et al., 1997). C-концевая часть проявляет в комплексообразующих тестах доминантный негативный фенотип. Это характерно и для точковых мутаций, находящихся вблизи, но за пределами трансмембранного домена А. Такая картина часто имеет место в гомо- или гетеро-олигомерных белках. В связи с этим важно, что гомолог VirB11 из плазмиды RP4 (TrbB) образует гомогексамеры в присутствии АТФ и ионов Mg^{2+} (Pansegrau et al., 1994). Наконец, TrwD, гомолог VirB11 из плазмиды R388, имеет как важные различия, так и сходства с VirB11. Выделенный белок имеет АТФ-азную активность *in vitro*. Кроме того, мутация в АТФ-связывающем мотиве была транс-доминантной, а значит, связывание АТФ и олигомеризация - сопряженные процессы. Белок TrwD может быть обнаружен как во внешней мембране, так и в растворимой фракции, независимо от присутствия других Trw-белков. TrwD может быть переведен в раствор из мембранной фракции с помощью 0,5М NaCl, то есть, по-видимому, он является периферическим мембранным белком (Rivas et al., 1997).

V.C. СХОДСТВО БЕЛКОВ VIRB И БЕЛКОВ ПИЛЕЙ СИСТЕМЫ КОНЪЮГАТИВНОГО ПЕРЕНОСА

Как показано на рисунке 1, оперон VirB сходен с системой конъюгативного переноса, специализирующейся на поверхностном спаривании и собирающей жесткие пили. Однако, биохимические данные о белках, входящих в их состав, за исключением гомологов VirB2, отсутствуют. К сожалению, система переноса, которая изучена на примере Mpf-белков плазмиды F, является менее родственной VirB чем у конъюгантов поверхностного типа: pKM101, RP4 или R388. Только белки VirB: B2, B3 и B4 имеют слабое сходство с TraA, TraL и TraC соответственно (Shirasu et al., 1993, 1994). Если основываться на этом сходстве, то VirB2-B3-B4 образуют кор (наименее вариативную часть) структуры сборки/выпячивания пилей. Отсутствие гомологии между белками сборки F-пилей и VirB-белками является интригующим, особенно при очевидном сходстве функций процессинга ДНК, представленных в таблице 2. В частности, плаزمид F не содержит гомологов VirB11, хотя он широко распространен среди ДНК-переносящих белков (Hobbs et al., 1993; Rivas et al., 1997). Поскольку VirB11-подобные белки представлены в системах белкового транспорта II, III и IV, но не в плазмиде F, возможно, что компоненты механизма сборки F-пилей отдаленно сходны с белками, представленными на рисунке 1.

VI. Опероны *virE* и *virF*

Оперон *virE* состоит из двух генов, *virE1* и *virE2*. В октопиновых Ti-плазмидах содержится только ген *virF*, который не представлен в нопалиновых Ti-плазмидах. Это обеспечивает взаимодействие с более широким спектром хозяев в случае октопиновых плазмид. Опероны *virE* и *virF* важно рассмотреть в этой главе, поскольку у штаммов *Agrobacterium*, дефектных по *virE2* или *virF*, можно восстановить способность к индукции опухолеобразования, используя хелперные штаммы, содержащие полный набор *vir*-генов, но не содержащие Т-область (Hooykaas et al., 1994). Более того, белки VirE2 и VirF переносятся в растительные клетки и даже могут быть выделены из транс-

генных растений, то есть они действуют в растении, а не обязательно вовлечены в транспорт Т-ДНК через бактериальные мембраны (Citovsky et al., 1992; Regensburg-Tuink et al., 1993). Имеющиеся генетические данные показывают, что переход VirF и VirE2 из *Agrobacterium* в растительные клетки может осуществляться в отсутствие Т-ДНК и целиком зависит от транспортной системы VirB. Однако, транспорт белков еще не показан напрямую. VirE2 (60.5 кД) - это белок, который прочно связывается с одонитевой ДНК. Этот процесс не является специфическим и белок может покрывать всю длину Т-ДНК (Christie et al., 1988). К Т-нити, размером 20 т.п.н., образуемой нопалиновой плазмидой, может присоединяться приблизительно 600 молекул VirE2, с образованием комплекса около 50×10^3 кД. С-концевая часть VirE2 содержит ДНК-связывающий домен, N-концевая отвечает за кооперативность связывания с ДНК (Глава 15; Dombek et al., 1997). VirE2 содержит два сигнала ядерной локализации, причем оба они требуются для импорта в ядро протопластов табака белка VirE2 (Citovsky et al., 1992). Свойства белка - связывание с одонитевыми ДНК и наличие сигнала ядерной локализации - показывают, что VirE2 может сам по себе осуществлять доставку в ядро одонитевых ДНК (Zupan et al., 1996). IncP-плазмиды кодируют VirE2-подобный TraC1, ДНК-связывающий белок, который переносится из донорной в реципиентную клетку при конъюгации (Rees et al., 1990). Помимо ДНК-связывающих свойств, TraC1 имеет праймазную активность для инициации превращения одонитевой ДНК в двунитевую. Такой активности у VirE2 *in vitro* не обнаружено. ДНК-связывающая функция TraC1 может играть роль в конъюгации, сходную с ролью белка VirE2, то есть защищать ДНК в процессе транспорта. «Запакковывание» ДНК защищает ее от деградации нуклеазами и/или способствует транспорту в виде нуклеопротеинового комплекса. Интригующим остается вопрос о том, зависит ли транспорт TraC1 от гомологов *virB* - *trb* генов реципиента.

VII. Аналогии с другими системами транспорта белков: перенос Т-комплекса и конъюгация используют путь экспорта белков IV типа

Система ДНК-независимого транспорта белков VirE2 и VirF (VirB) сходна с системой белкового экспорта - Ptl *Bordetella pertussis* (рис. 1). Однако структурного сходства между pertussis-токсином, белковым комплексом из пяти различных субъединиц, и двумя белками Vir не обнаружено. Это показывает, что транспортный аппарат Т-комплекса может распознавать широкий спектр белков-мишеней. Существование Ptl системы вызывает споры относительно химической природы молекул, которые распознаются и транспортируются посредством Ti-подобного механизма экспорта. Перенос Т-ДНК можно рассматривать как транспорт нуклеопротеинов, а значит, он родственен другим механизмам белкового транспорта (Regensburg-Tuink et al., 1993). Противоположным является мнение о том, что система транспорта ДНК применяется для экспорта патогенных макромолекул (Winans et al., 1996). Анализ данных о разнообразных системах транспорта ДНК, имеющихся в природе, показал, что в большинстве случаев транспортные системы используют одонитевые молекулы нуклеиновых кислот, устойчиво связанных со специфическими белками (Citovski, Zambryski, 1993). Большое внимание уделено потенциальной секреторной системе *H. pylori*, предназначенной для экспорта детерминант вирулентности (табл. 1). В хромосоме *H. pylori* обнаружен островок патогенности, имеющий явную гомологию с VirB4, B9, B10 и B11, а также с VirD4 (Censim et al., 1996; Covacci et al., 1997; Tomb et al., 1997).

Гомология с VirD4 приводит к новому теоретическому заключению. В нашей схеме белкового транспорта TraG-подобные белки считались уникальными для систем секреции IV типа, поскольку были обнаружены во всех конъюгативных плаزمидях, включая F (Lessl et al., 1992a; Nunez et al., 1996). Напротив, системы, не связанные с транспортом ДНК, никогда не имеют TraG-гомологов. Это согласуется с предполагаемой ролью данных белков как связующего звена между релаксасомой и транспортным аппаратом (раздел IV.B). Наше предположение основано на присутствии ORF10 в локусе *cagII* *H. pylori*. Поразительно то, что островки патогенности, по-видимому, обладают мобильностью, передаваясь из одной бактерии в другую посредством пока не известного механизма, активного, вероятно, только в инфицированных организмах (Mel et al., 1996).

Если мы правы, то *cagII* может быть остатком конъюгативной системы транспорта ДНК, поскольку содержит гомолог *TraG*. Возможно, что *TraG* будут обнаружены и у *B. pertussis*. Поиски гомологов *TraG* могут снять завесу таинственности с механизмов транспорта ДНК не только в бактерии, но и в растительные, а также в прочие эукариотические клетки.

Гомология *VirB11* с белками системы транспорта типа II показывает, что использование *VirB*-подобных белков в механизмах белкового транспорта может быть скорее правилом, чем исключением. Недавно обнаружено, что система секреции типа III доставляет бактериальные белки в эукариотические клетки (Lee, 1997). Эта система может быть также названа контакт-зависимой, поскольку для активации белкового транспорта необходим контакт с эукариотической клеткой (Galan, 1996). Более того, секреторная активность сопровождается аккумуляцией вне клетки филаментов, которые характерны и внешне аналогичны конъюгативным пилиям (Parsot et al., 1995). Все эти факты позволяют сделать вывод о том, что основная система секреции белков (II типа) (Pugsley, 1993) является основой специализации с образованием или системы инъекции белков (секреция III типа), или системы переноса ДНК, она же конъюгативная система (секреция IV типа). На первом этапе экспортируемый субстрат может быть филаментным белком, и внеклеточные образования формируются для содействия, например, прикреплению к клетке-мишени (образование пилинов, сходных с системой секреции II типа). На втором этапе экспортируемый субстрат, например токсин, может быть введен в клетку-мишень посредством внеклеточных образований внедряющихся в нее, или за счет тесного контакта мембраны реципиента с донорной клеткой путем их сокращения (тип III). Одна из этих систем эволюционировала в направлении использования нуклеопротеинового комплекса в качестве экспортного субстрата так, чтобы нуклеиновая кислота могла переноситься в другую клетку. Конъюгативный путь, который назван системой секреции белков IV типа (Salmond, 1994), считается уникальным и заметно отличается от других систем транспорта белка (Salmond et al., 1993; Regensburg-Tuink, Hooykaas, 1993; Christie, 1997).

Система экспорта белков IV типа включает не только аппарат для переноса Т-ДНК *Ti*-плазмиды и ДНК при бактериальной конъюгации, но также может включать другие транспортные системы, такие как изгнание фага M13 и поглощение ДНК при трансформации у грам-положительных бактерий. Изучение основных аспектов белкового и нуклео-протеинового транспорта может привести к построению общей схемы, описывающей транспорт ДНК между клетками.

VIII. Благодарности

Мы признательны Ellen Zechner и Matxalen Llosa за критическое прочтение и правку рукописи. Работа поддержана грантами (PB95-1269) из D.G.I.C.Y.T. to F.C. и Sonderforschungsbereich grant B344/A8 of the Deutsche Forschungsgemeinschaft to EL.

IX. Литература

- Alt-Moerbe J., Stryker J.I., Fuqua C., Li P.L., Farrand S.K., Winans S.C. (1996) J. Bacteriol. V. 178, p. 4248-4257.
 Anderson L.B., Hertz A.V., Das A. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 93, p. 8889-8894.
 Avila P., Nufiez B., de la Cruz F. (1996) J. Mol. Biol. V. 261, p. 135-143.
 Balzer D., Pansegrau W., Lanka E. (1994) J. Bacteriol. V. 176, p. 4285-4295.
 Baron C., Llosa M., Zhou S., Zambryski P.C. (1997a) J. Bacteriol. V. 179, p. 1203-1210.
 Baron C., Thorstenson Y.R., Zambryski P.C. (1997b) J. Bacteriol. V. 179, p. 1211-1218.
 Baron C., Zambryski P.C. (1996) Curr. Biol. V. 6, p. 1567-1569.
 Bayer M., Eferi R., Zeilnig G., Teferle K., Dijkstra A., Koraimann G., Hagenauer G. (1995) J. Bacteriol. V. 177, p. 4279-4288.
 Beaupre C.E., Bohne J., Dole E.M., Binns A.N. (1997) J. Bacteriol. V. 179, p. 78-89.
 Beijersbergen A., Dulk-Ras A.D., Schilperoort R.A., Hooykaas P.J.J. (1992) Science. V. 256, p. 1324-1327.
 Beijersbergen A., Smith S.J., Hooykaas P.J.J. (1994) Plasmid. V. 32, p. 212-218.
 Berger B.R., Christie P.J. (1993) J. Bacteriol. V. 175, p. 1723-1724.
 Berger B.R., Christie P.J. (1994) J. Bacteriol. V. 176, p. 3646-3660.
 Binns A.N., Beaupre C.E., Dale E.M. (1995) J. Bacteriol. V. 177, p. 4890-4899.

- Bolland S. (1992) Ph.D. thesis, University of Cantabria, Spain.
- Buchanan-Wollaston V., Passiatore J.E., Cannon F. (1987) *Nature*. V. 328, p. 172-175.
- Bundock P., den Dulk-Ras A., Beijersbergen A., Hooykaas P.J.J. (1995) *EMBO J.* V. 14, p. 3206-3214.
- Bundock P., Hooykaas P.J.J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 93, p. 15272-15275.
- Cabezón E., Lanka E., de la Cruz F. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 4455-4458.
- Cabezón E., Sastre J.L., de la Cruz F. (1997) *Mol. Gen. Genet.* V. 254, p. 400-406.
- Censini S., Lange C., Xiang Z., Crabtree J.E., Ghiara P., Brodovsky M., Rappuoli R., Covacci A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 93, p. 14648-14653.
- Christie P.J. (1997) *J. Bacteriol.* V. 179, p. 3085-3094.
- Christie P.J., Ward J.E., Winans S.C., Nester E.W. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 2659-2667.
- Christie P.J., Ward J.E., Gordon M.P., Nester E.W. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 86, p. 9677-9681.
- Citovsky V., Zambryski P. (1993) *Annu. Rev. Microbiol.* V. 47, p. 167-197.
- Citovsky V., Zupan J., Wamick D., Zambryski P. (1992) *Science*. V. 256, p. 1802-1805.
- Chimo M.W., Sharma V.K., Archer G.L. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 4975-4983.
- Covacci A., Falkow S., Berg D.E., Rappuoli R. (1997) *Trends Microbiol.* V. 5, p. 205-208.
- Dang T.A.T., Christie P.J. (1997) *J. Bacteriol.* V. 179, p. 453-462.
- Dombek P., Ream W. (1997) *J. Bacteriol.* V. 179, p. 1165-1173.
- Dreisknecht B. (1994) *Microbiol. Rev.* V. 58, p. 293-316.
- Duerrenberger M.B., Villiger W., Baechli T. (1991) *J. Struct. Biol.* V. 107, p. 146-156.
- Erickson M.J., Meyer R.J. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 7, p. 289-298.
- Farrand S.K., Hwang I., Cook D.M. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 4223-4247.
- Fernandez D., Dang T.A.T., Spudich G.M., Zhou X., Berger B.R., Christie P.J. (1996b) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 3156-3167.
- Fernandez D., Spudich G.M., Zhou X., Christie P.J. (1996a) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 3168-3176.
- Finberg K.E., Muth T.R., Young S.P., Maken J.B., Heitritter S.M., Binns A.N., Banta L.M. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 4881-4889.
- Firth N., Ippen-Ihler K., Skurray R.A. (1996) In: Neidhardt FC *«Escherichia coli and Salmonella»* (2-nd edition). ASM Press. Washington, DC.
- Freiberg C., Fellay R., Bairoch A., Broughton W.J., Rosenthal L., Perret X. (1997) *Nature*. V. 387, p. 384-401.
- Frost L.S., Bazett-Jones D.P. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 7728-7731.
- Fullner K.J., Lara J.C., Nester E.W. (1996b) *Science*. V. 273, p. 1107-1109.
- Fullner K.J., Nester E.W. (1996a) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 1498-1504.
- Fullner K.J., Stephens K.M., Nester E.W. (1994) *Mol. Gen. Genet.* V. 245, p. 704-715.
- Fuerste J., Pansegrau W., Ziegelin G., Krüger M., Lanka E. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 6, p. 1771-1775.
- Galan J.E. (1996) *Mol. Microbiol.* V. 20, p. 263-271.
- Graaff van der E., den Dulk-Ras A., Hooykaas P.J.J. (1996) *Plant Mol. Biol.* V. 31, p. 677-681.
- Guzman L.M., Espinosa M. (1997) *J. Mol. Biol.* V. 266, p. 688-702.
- Haase J., Lurz R., Grahn M., Bamford D.H., Lanka E. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 4779-4791.
- Haase J., Lanka E. (1997) *J. Bacteriol.* V. 179, p. 5728-5735.
- Haaren van M.J.J., Sedee N.J.A., Schilperoord R.A., Hooykaas P.J.J. (1987) *Plant Mol. Biol.* V. 8, p. 95-104.
- Hamington L.C., Rogerson A.C. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 7263-7264.
- Heinemann J.A., Sprague Jr. G.F. (1989) *Nature*. V. 340, p. 205-209.
- Hobbs M., Mattick J.S. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 10, p. 233-243.
- Hooykaas P.J.J., Beijersbergen A. (1994) *Annu. Rev. Phytopathol.* V. 32, p. 157-179.
- Ilyina T.V., Koonin E.V. (1992) *Nucleic Acids Res.* V. 13, p. 3279-3285.
- Jones A.L., Lai E., Shirasu K., Kado C.I. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 5706-5711.
- Jones A.L., Shirasu K., Kado C.L. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 5255-5261.
- Joos H., Inze D., Caplan A., Sormann M., van Montagu M., Schell J. (1983) *Cell*. V. 32, p. 1057-1067.
- Kado C.I. (1994) *Mol. Microbiol.* V. 12, p. 17-22.
- Kim S.R., Komano T. (1997) *J. Bacteriol.* V. 179, p. 3594-3603.
- Kingsman A., Willetts N. (1978) *J. Mol. Biol.* V. 122, p. 287-300.
- Klein P., Kanehisa M., DeLisi C. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*. V. 815, p. 468-476.
- Kornberg A., Baker T. (1992) *DNA replication*. WH Freeman & Co., NY (2-nd edition).
- Koukolikova-Nicola Z., Raineri D., Stephens K., Ramos C., Tinland B., Nester E.W., Hohn B. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 723-731.
- Lanka E., Wilkins B.M. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* V. 64, p. 141-169.
- Lee C.A. (1997) *Trends Microbiol.* V. 5, p. 148-156.
- Lessl M., Balzer D., Pansegrau W., Lanka E. (1992b) *J. Biol. Chem.* V. 267, p. 20471-20480.
- Lessl M., Balzer D., Weyrauch K., Lanka E. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 6415-6425.
- Lessl M., Lanka E. (1994) *Cell*. V. 77, p. 324.
- Lessl V.I., Pansegrau W., Lanka E. (1992a) *Nucleic Acids Res.* V. 20, p. 6099-6100.
- Lloa M., Grandoso G., de la Cruz F. (1995) *J. Mol. Biol.* V. 246, p. 54-62.
- Lloa M., Grandoso G., Hernando M.A., de la Cruz F. (1996) *J. Mol. Biol.* V. 264, p. 56-67.
- Mel S.F., Mekalanos J.J. (1996) *Cell*. V. 87, p. 795-798.
- Miranda A., Janssen G., Hodges L., Pirdlta E.G., Ream W. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 2288-2297.

- Moncahan G., Grandoso G., Llosa M., de la Cruz F. (1997) *J. Mol. Biol.* V. 270, p. 188-200.
- Murphy C.G., Malamy M.H. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 3158-3165.
- Mushegian A.R., Fullner K.J., Koonm E.V., Nester E.W. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 93, p. 7321-7326.
- Nunez B., Avila P., de la Cruz F. (1997) *Mol. Microbiol.* V. 24, p. 1157-1168.
- Okamoto S., Toyoda-Yamamoto A., Ito K., Takebe I., Machida Y. (1991) *Mol. Gen. Genet.* V. 228, p. 24-32.
- Paiva W.D., Grossman T., Silverman P.M. (1992) *J. Biol. Chem.* V. 267, p. 26191-26197.
- Paiva W.D., Silverman P.M. (1996) *Mol. Microbiol.* V. 19, p. 1277-1286.
- Pamcker M.M., Minkley Jr. E.G. (1992) *J. Biol. Chem.* V. 267, p. 12761-12766.
- Pansegrau W., Balzer D., Kruff V., Lurz R., Lanka E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 87, p. 6555-6559.
- Pansegrau W., Lanka E. (1991) *Nucl. Acids Res.* V. 19, p. 3455.
- Pansegrau W., Lanka E. (1996) *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.* V. 54, p. 197-251.
- Pansegrau W., Schoumacher F., Hohn B., Lanka E. (1993b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 90, p. 11538-11542.
- Pansegrau W., Schroder W., Lanka E. (1993a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 90, p. 2925-2929.
- Pansegrau W., Schroder W., Lanka E. (1994) *J. Biol. Chem.* V. 269, p. 2782-2789.
- Parsot C., Menard R., Gounon P., Sansonetti P.J. (1995) *Mol. Microbiol.* V. 16, p. 291-300.
- Peralta E.G., Ream L.W. (1985) In: Szalay A.A., Legocki R.P. (eds). *Advances in the molecular genetics of the bacteria-plant interaction.* Cornell Univ. Publ. Ithaca, NY.
- Piers K.L., Hcath J.D., Liang X., Stephens K.M., Nester F.W. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 93, p. 1613-1618.
- Pohlman R.F., Genetti H.D., Winans S.C. (1994) *Mol. Microbiol.* V. 14, p. 655-668.
- Pugsley A.P. (1993) *Microbiol. Rev.* V. 57, p. 50-108.
- Rashkova S., Spudich G.M., Christie P.J. (1997) *J. Bacteriol.* V. 179, p. 583-591.
- Rees C.E.D., Wilkins B.M. (1990) *Mol. Microbiol.* V. 4, p. 1199-1205.
- Regensburg-Tuink A.J.G., Hooykaas P.J.J. (1993) *Nature.* V. 363, p. 69-71.
- Rivas S., Bolland S., Cabezon E., Gom F.M., de la Cruz F. (1997) *J. Biol. Chem.* V. 272, p. 25583-25590.
- Salmond G.P. (1994) *Annu. Rev. Phytopathol.* V. 3, p. 181-200.
- Salmond G.P., Reeves P.J. (1993) *Trends Biochem. Sci.* V. 18, p. 7-12.
- Scheffele P., Pansegrau W., Lanka E. (1995) *J. Biol. Chem.* V. 270, p. 1269-1276.
- Scherzinger E., Lurz R., Otto S., Dobrinski B. (1992) *Nucl. Acids Res.* V. 20, p. 41-48.
- Sherman J.A., Matson S.W. (1994) *J. Biol. Chem.* V. 269, p. 26220-26226.
- Shirasu K., Kado C.I. (1993) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 111, p. 287-294.
- Shirasu K., Koukhokova-Nicola Z., Hohn B., Kado C.I. (1994) *Mol. Microbiol.* V. 11, p. 581-588.
- Silverman P.M. (1997) *Mol. Microbiol.* V. 23, p. 423-429.
- Spudich G.M., Fernandez D., Zhou X., Christie P.J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 93, p. 7512-7517.
- Stachel S.E., Timmerman B., Zambryski P. (1986) *Nature.* V. 322, p. 706-712.
- Stachel S.E., Timmerman B., Zambryski P. (1987) *EMBO J.* V. 6, p. 857-863.
- Stephens K.M., Roush C., Nester E.W. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 27-36.
- Thorntenson Y.R., Kuldau G.A., Zambryski P.C. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 5233-5241.
- Thorntenson Y.R., Zambryski P.C. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 1711-1717.
- Tinland B., Schoumacher F., Gloeckler V., Bravo-Angel A.M., Hohn B. (1995) *EMBO J.* V. 14, p. 3585-3595.
- Tomb J.F., White O., Kerlavage A.R., Clayton R.A., Sutton G.G., Fleischmann R.D., Ketchum K.A., Klenk H.P., Gill S., Dougherty B.A., Nelson K., Quackenbush J., Zhou L., Kirkness E.F., Peterson S., Loftus B., Richardson D., Dodson R., Khalak H.G., Glodek A., McKenney K., Fitzgerald L.M., Lee N., Adams M.D., Hickey E.D., Berg D.E., Gocayne J.D., Utterback T.R., Peterson J.D., Kelly J.M., Cotton M.D., Weidman J.M., Bowman C., Watthey L., Wallm E., Haynes W.S., Borodovsky M., Karp P.D., Smith H.O., Fraser C.M., Venter J.C. (1997) *Nature.* V. 388, p. 539-547.
- Veluthambi K., Ream W., Gelvin S. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 1523-1532.
- Ward J.E., Akiyoshi D.E., Regier D., Datta A., Gordon M.P., Nester E.W. (1988) *J. Biol. Chem.* V. 263, p. 5804-5814.
- Ward J.E., Dale E.M., Nester E.W., Binns A.N. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 5200-5210.
- Waters V.L., Strack B., Pansegrau W., Lanka E., Gumey D.G. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 6666-6673.
- Weiss A.A., Johnson F.D., Burns D.L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 90, p. 2970-2974.
- Willets N., Wilkins B.M. (1984) *Microbiol. Rev.* V. 48, p. 24-41.
- Winans S.C., Burns D.L., Christie P.J. (1996) *Trends Microbiol.* V. 4, p. 64-68.
- Winans S.C., Walker G.C. (1985) *J. Bacteriol.* V. 161, p. 402-410.
- Zambryski P.C. (1992) *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* V. 43, p. 465-490.
- Ziegelm G., Pansegrau W., Strack B., Balzer D., Kroger M., Kruff V., Lanka E. (1991) *DNA Seq.* V. 1, p. 303-327.
- Zupan J.R., Citovsky V., Zambryski P.C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 93, p. 2392-2397.

Функции белков вирулентности агробактерий в растении

Росси Л., Тинланд Б., Хон Б.

I.	Введение.....	327
II.	Процессинг Т-ДНК.....	328
III.	Т-комплекс (Т-ДНК+VirD2+VirE2).....	330
	III.A. Перенос комплекса Т-ДНК+VirD2 и VirE2 в растительную клетку	330
	III.B. Присоединение белка VirE2 к комплексу Т-ДНК+VirD2.....	331
	III.C. Сравнение переноса Т-ДНК и бактериальной конъюгации.....	332
IV.	Перенос Т-комплекса в ядро растительной клетки.....	333
	IV.A. Доставка в ядро.....	333
	IV.B. Сравнение переноса нуклеиновых кислот в составе Т-комплекса и при вирусной инфекции.....	334
V.	Интеграция Т-ДНК.....	336
	V.A. Роль растительных ферментов.....	336
	V.B. Роль белков VirD2 и VirE2.....	337
VI.	Горизонтальный перенос генов.....	337
VII.	Перспективы исследований.....	339
VIII.	Благодарности.....	341
IX.	Литература.....	343

I. Введение

Патогенная для многих двудольных бактерия *Agrobacterium tumefaciens* способна переносить в растительные клетки участок собственной ДНК, получивший название Т-ДНК (от англ.: transferred DNA). Т-ДНК встраивается в геном растения-хозяина, после чего начинается экспрессия входящих в ее состав генов (глава 12). В бактериальных клетках Т-ДНК находится в составе больших плазмид, называемых Ti-плазмидами. Т-ДНК на плазмиде фланкирована прямыми повторами из 25 п.н., называемыми правой и левой границей, соответственно. Как только бактерия обнаруживает подходящее для трансформации растение, в ней индуцируется экспрессия ряда генов вирулентности, также расположенных на Ti-плазмиде. «Нижняя» нить ДНК на левой и правой границе Т-ДНК разрезается сайт-специфичной эндонуклеазой, состоящей из белков VirD1 и VirD2, с образованием одонитевой молекулы ДНК (онДНК), которая в дальнейшем переносится в растительную клетку. Этот этап процессинга связан с последующим экспортом Т-ДНК из бактерий: вплоть до интеграции Т-ДНК в растительный геном белок VirD2 остается ковалентно присоединенным к ее 5'-концу. Это позволило предположить, что в состав VirD2 входит сигнал, направляющий перенос Т-ДНК. Считается, что именно белок VirD2 обеспечивает: а) выход Т-ДНК из агробактериальной клетки через специальную пору, б) попадание Т-ДНК из цитоплазмы растительной клетки в ее ядро, в) защиту 5' конца Т-ДНК от нуклеаз, г) интеграцию Т-ДНК в хромосомы растения. Другим белком вирулентности, способным связываться с онДНК и, по-видимому, сопровождающим Т-ДНК на протяжении всего пути в ядро растительной клетки, является VirE2, который присоединяется к Т-ДНК по всей ее длине.

В каждую растительную клетку агробактерии способны передать небольшое число молекул Т-ДНК. Тем не менее, трансформация представляет собой весьма эффективный процесс. По-видимому, его эффективность связана с тем, что Т-ДНК переносится в растительную клетку не сама по себе, а в комплексе с белками.

II. Процессинг Т-ДНК

В процессе заживления ранок поврежденные растительные клетки продуцируют лигнин. Его предшественниками являются фенольные компоненты, в частности, ацетосирингон, привлекающие агробактерий и индуцирующие экспрессию *vir*-генов, которые обеспечивают перенос Т-ДНК (рис. 1,А). Конститутивно экспрессирующийся ген *virA* кодирует сенсорный белок, который является прямым или опосредованным рецептором ацетосирингона (глава 12), а также регистрирует низкие значения pH (5.0-5.8) и присутствие некоторых сахаров, в особенности мономеров основных полисахаридов клеточной стенки. Все эти сигналы вносят свой вклад в индукцию автофосфорилирования белка VirA. Фосфатная группа активированного VirA переносится на белок VirG. Фосфорилированный VirG выступает в качестве активатора транскрипции *vir*-оперонов, по-видимому, за счет присоединения к *vir*-боксам, расположенным в 5'-некодирующем районе *vir*-оперонов. Продукты *vir*-генов высвобождают Т-ДНК из Ti-плазмиды (процессинг) и обеспечивают ее доставку в ядро растительной клетки.

Первые два гена *vir*D-оперона, *virD1* и *virD2*, обеспечивают собственно процессинг Т-ДНК. Предположительно, помогают им в этом продукты *virC*-оперона и, в особенности, белок VirC2. Белок VirD2 способен осуществить *in vitro* сайт-специфичное разрезание онДНК, содержащей последовательности границ Т-ДНК (Pansegrau et al., 1993), однако для разрезания двунитевой ДНК (днДНК) необходимо также участие белка VirD1 (Scheiffele et al., 1995). В условиях как *in vivo*, так и *in vitro*, белок VirD2 производит надрез между 3 и 4 нуклеотидами нижней нити границы Т-ДНК и присоединяется к 5'-концу молекулы (Ward, Barnes, 1988; Young, Nester, 1988; Durrnberger et al., 1989), по-видимому, через тирозин в положении 29 (Vogel, Das, 1992; Pansegrau et al., 1993). Затем Т-ДНК с присоединенным к ней белком VirD2 вытесняется ре-синтезируемой нижней нитью и, таким образом, формируется комплекс онТ-ДНК-VirD2.

VirE2 является наиболее активно синтезируемым среди всех белков, образующихся в *A. tumefaciens* после индукции растительными фенолами (Stachel, 1986a). В условиях *in vitro* он способен к неспецифичному связыванию с онДНК, но не с днДНК или РНК, причем уже связанные с ДНК молекулы белка способствуют присоединению свободных молекул (Gietl, 1987; Sen, 1989; Christie, 1988; Citovsky, 1988, 1989; Das, 1988). С помощью электронной микроскопии с затемнением платиновыми частицами показано, что комплекс онДНК-VirE2 составляет в толщину 2 нм и в длину 0.18 нм в пересчете на нуклеотид (Citovsky, 1989). Таким образом, присоединение белка VirE2 удлиняет онДНК на 55%. К Т-нити, имеющей размер около 20 т.п.н., присоединяется более 600 молекул VirE2 и ее суммарный вес составляет 50×10^6 дальтон. Благодаря возможностям сканирующего электронного микроскопа показано, что VirE2 упаковывает онДНК в жесткий полый цилиндрический филамент диаметром 12.8 нм, похожий на телефонный шнур. При растяжении эта спиралевидная структура приобретает длину 4.3 нм, что сопоставимо с вышеописанным 2 нм комплексом (Lartey, Citovsky, 1997).

Способность белка VirE2 присоединяться к онДНК позволяет предположить, что в клетках агробактерии он связывается с комплексом Т-ДНК-VirD2, формируя Т-комплекс. В настоящее время эта гипотеза подвергается сомнению по двум причинам. Во-первых, сверхэкспрессия VirE2 в растении полностью восстанавливает вирулентность штаммов *A. tumefaciens*, несущих мутации в гене *virE2* (Citovsky et al., 1992). Во-вторых, мутация или делеция этого гена никак не сказывается на процессинге Т-ДНК в агробактерии (Stachel, 1986b; Rossi et al., 1996). Таким образом, белок VirE2 не участвует в формировании Т-комплекса, он необходим для переноса Т-ДНК (Stachel, 1986b; Gardner, 1986; Christie, 1988; Grimsley, 1989; Rossi, 1996) и работает только в растительной клетке (Citovsky et al., 1992). Эти данные не исключают присоединения VirE2 к Т-нити непосредственно перед началом переноса, но необходимость этого не подтверждается фактами. Прямое

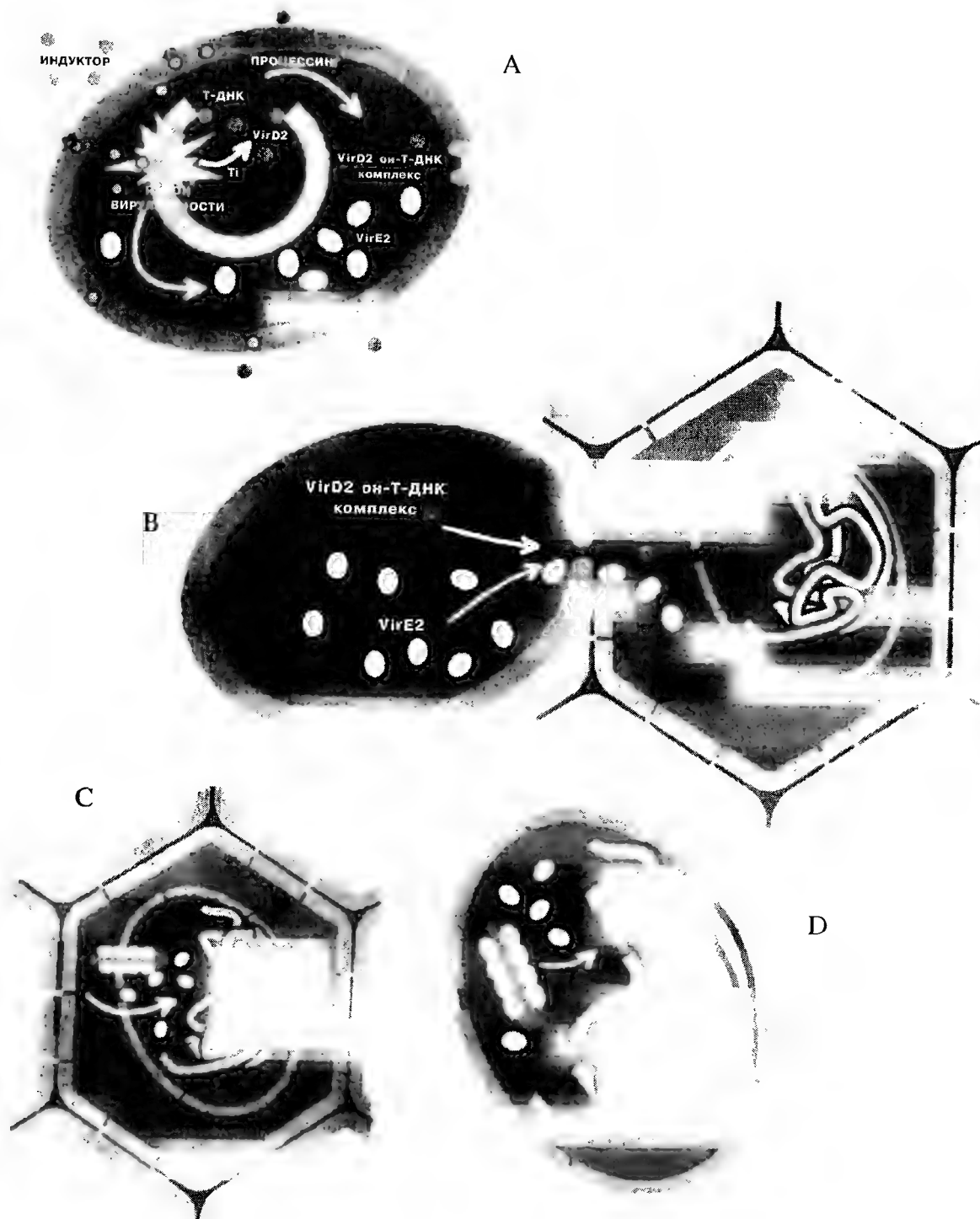


Рисунок 1. Генетическая трансформация агробактериями растительной клетки.

А. Процессинг Т-ДНК.

В. Перенос Т-ДНК в растительную клетку.

С. Импорт Т-комплекса в ядро.

Д. Интеграция Т-ДНК в геном растения.

доказательство взаимодействия Т-нити с VirE2 было получено из опытов по иммунопреципитации Т-нитей антителами к белку VirE2 (Christie et al., 1988). Однако нельзя исключить того, что сам комплекс образовался непосредственно при выделении. Аналогичные данные, касающиеся ассоциации с Т-нитью в бактериальной клетке, получены для белка AcsV (гомолог VirJ), присутствующего в октопиновом штамме A208. Штаммы с инсерцией Tn5 в гене *acsV* оказались авирулентными (Wirawan et al., 1996; Yoshioka et al., 1996), что предполагает участие этого белка в Т-комплексе на некоторых существенных этапах переноса Т-ДНК.

Показано, что другой белок вирулентности, специфичный для октопинового штамма, VirF, выполняет важную роль при переносе Т-ДНК внутри растительной клетки. Нопалиновые или октопиновые штаммы с мутацией в гене *virF* характеризовались слабой вирулентностью на томатах (Hooykaas et al., 1984) и табаке (Melchers et al., 1990). Вирулентность таких штаммов может быть полностью восстановлена при их культивировании с растениями *Nicotiana glauca*, синтезирующими белок VirF. Вероятнее всего, этот белок попадает в растительные клетки при культивировании с *A. tumefaciens* октопинового типа и каким-то образом способствует переносу Т-ДНК (Regensburg-Tuink, Hooykaas, 1993).

III. Т-комплекс (Т-ДНК+VirD2+VirE2)

III.A. ПЕРЕНОС КОМПЛЕКСА Т-ДНК+VIRD2 И VIRE2 В РАСТИТЕЛЬНУЮ КЛЕТКУ

Трансформация растений, производимая *A. tumefaciens*, требует прикрепления бактерий к поврежденному участку растения. Оно происходит, по-видимому, в процессе индукции *vir*-генов и определяется работой серии хромосомных генов агробактерий (глава 11). Прикрепление необходимо для переноса Т-ДНК, однако если искусственно поместить бактерию внутрь растительной клетки, перенос ДНК осуществится и без прикрепления (Escudero et al., 1995). Связанная с растительной клеткой или попавшая в нее агробактерия экспортирует комплекс онТ-ДНК+VirD2 и VirE2 (рис. 1,В). В клетках агробактерий в результате процессинга образуется онТ-ДНК и в единичном состоянии она обнаруживается в ядре растительной клетки (Tinland et al., 1994; Yusibov et al., 1994). Таким образом, именно онДНК способна пройти сквозь все барьеры, стоящие на пути в ядро.

Первым барьером является собственная мембрана *A. tumefaciens*. Экспорт онТ-ДНК+VirD2 из агробактерии в основном определяется геном *virD4* и опероном *virB*. 9 из 11 открытых рамок считывания, входящих в состав *virB*-оперона, кодируют белки, содержащие гидрофобные участки, пронизывающие мембрану. Очевидно, что большая часть белков VirB ассоциирована с бактериальной мембраной. Белки VirB4 (Berger, Christie, 1993), VirB8 (Dale et al., 1993), VirB9 и VirB10 (Ward et al., 1990), VirB11 (Christie et al., 1989), также как и пронизывающий мембрану белок VirD4 (Lin, Kado, 1993) оказались особенно важными для индукции опухолеобразования. Возможно, они формируют структуру, необходимую для переноса комплекса онТ-ДНК-VirD2 в растительные клетки. Обнаружение у белков VirB4 и VirB11 сайтов связывания с АТФ и АТФ-азной активности предполагает их участие в производстве энергии, необходимой для транспорта комплекса через мембрану (Christie, 1997).

Поскольку свои главные функции белок VirE2 выполняет в растительной клетке, он также должен быть экспортирован из бактерий. Его экспорт, как и перенос Т-ДНК в комплексе с VirD2, осуществляется за счет работы генов *virB*. Вероятнее всего, VirE2 следует тем же путем, что и комплекс онТ-ДНК+VirD2. Показано, что белок VirE2, синтезируемый штаммом *A. tumefaciens* без Т-ДНК, может полностью восстановить перенос Т-ДНК из штамма, несущего мутацию в гене *virE2* (Otten et al., 1984). Таким образом, экспорт VirE2 и перенос Т-ДНК не зависят друг от друга (этот феномен получил название внеклеточной комплементации). Дальнейшие опыты показали, что как у штамма-донора VirE2, названного помощником, так и у донора Т-ДНК должны нормально функционировать гены *virB* и *virD4*, а также гены, ответственные за прикрепление бактерий к растению (Christie et al., 1988). В отличие от донора Т-ДНК, штамму-помощнику не нужно

присутствие белка VirD2 (Fullner et al., 1994). Мы задались вопросом, связана ли авирулентность штамма *A. tumefaciens*, несущего мутации в генах *virB*, только с его неспособностью к экспорту белка VirE2. Мы хотели проверить, можно ли восстановить способность к переносу Т-ДНК у штамма-донора с дефектными белками VirB, за счет нормального экспорта VirE2 штаммом-помощником, лишенным Т-ДНК. Комплементации в этом опыте обнаружено не было, из чего мы сделали вывод, что перенос Т-ДНК *per se* невозможен без белков VirB, и что VirE2 и комплекс онТ-ДНК+VirD2 используют продукты генов *virB* для своего переноса независимо (Rossi, неопубликованные данные).

Показано, что экспорт VirE2, но не комплекса Т-ДНК+VirD2, зависит от присутствия белка VirE1 (Sundberg et al., 1996). В клетках агробактерий, имеющих делецию гена *virE1*, синтез белка VirE2 идет нормально, но он не поступает в растительную клетку, что резко снижает эффективность трансформации. При этом транспорт Т-ДНК из бактерии в растение не нарушен, что еще раз подтверждает независимость экспорта VirE2 и Т-ДНК. Поскольку отсутствие VirE2 приводит к авирулентности агробактерий, но не влияет на транспорт Т-ДНК в растение, можно постулировать, что работа белка VirE2 ограничивается пределами растительной клетки. Эта гипотеза имеет два подтверждения. В первом из опытов было показано полное восстановление вирулентности штамма, мутантного по гену *virE2*, при заражении трансгенных растений, способных к синтезу VirE2 (Citovsky et al., 1992). Второе доказательство было получено в опытах по введению плазмиды RSF1010 в *A. tumefaciens*. Эта плаزمида имеет широкий круг хозяев, принадлежит к группе несовместимости IncQ и может передаваться между бактериями при конъюгации. Для переноса между бактериями необходим белок MobA, надрезающий плазмиду в сайте ориджина и затем ковалентно прикрепляющийся к ДНК. *A. tumefaciens* способна транспортировать RSF1010 в растительные клетки, несмотря на отсутствие повторов левой и правой границ Т-ДНК, существенных для распознавания белком VirD2. Для транспорта в растение необходимо присутствие некоторых Vir-белков, кодируемых Ti-плазмидой (Buchanan-Wollaston et al., 1987). При наличии у бактерий мультикопийной плазмиды RSF1010 и Ti-плазмиды с Т-ДНК между ними наблюдается конкуренция за перенос в растительную клетку, по-видимому, связанная с лимитированным количеством некоторых факторов переноса. Оба комплекса, Т-ДНК+VirD2 и RSF1010+MobA, не могут попасть в ядро растительной клетки без участия белка VirE2. Сверхэкспрессия VirE2 в бактерии, содержащей оба комплекса, не повышает эффективность переноса Т-ДНК и практически не влияет на транспорт RSF1010. Однако перенос RSF1010 может быть усилен при внеклеточной комплементации штаммом, содержащим белок VirE2 (Binns et al., 1995). Это показывает, что связывание VirE2 с онДНК комплексов Т-ДНК+VirD2 и RSF1010+MobA происходит только после их попадания в растительную клетку.

III.B. ПРИСОЕДИНЕНИЕ БЕЛКА VIRE2 К КОМПЛЕКСУ Т-ДНК+VIRD2

Способность белка VirE2 связываться с онДНК в опытах *in vitro* показывает, что он присоединяется к комплексу онТ-ДНК+VirD2 на одном из этапов переноса. Это было подтверждено путем сравнения эффективности встраивания в растительный геном Т-ДНК из штамма с делецией *virE2* и штамма дикого типа. Оказалось, что в случае *virE2* штамма в хромосомы растения с очень низкой частотой встраивались в основном сильно поврежденные молекулы Т-ДНК, тогда как при гораздо более эффективной трансформации штаммом дикого типа во встроившихся Т-ДНК обнаруживались лишь небольшие делеции. При этом в клетках обоих штаммов длина и количество Т-нитей не различались. Таким образом, роль белка VirE2 сводится к защите онТ-ДНК от растительных нуклеаз (Rossi et al., 1996) за счет тесного контакта белковых молекул с поверхностью Т-ДНК. Это подтверждается следующими фактами: 1) в условиях *in vitro* комплексы онДНК+VirE2 устойчивы к нуклеазам (Sen et al., 1988; Citovsky et al., 1989); 2) в цитоплазме протопластов, культивируемых совместно с *virE2* штаммом, обнаруживается меньшее количество Т-ДНК, чем при использовании штаммов дикого типа (Yusibov et al., 1994); 3) для переноса в растительные клетки бинарных искусственных бактериальных хромосом необходимо дополнительное количество белка VirE2 (Hamilton et al., 1996).

Как уже было отмечено, белок VirE2 и комплекс Т-ДНК+VirD2 попадают в растительную клетку независимо с использованием несколько различающихся транспортных элементов (например, белок VirE1). Хотя нельзя окончательно исключить возможность того, что в норме белок VirE2 все же присоединяется к комплексу Т-ДНК+VirD2 с формированием полного Т-комплекса, по нашему мнению, маловероятно существование специальной системы транспорта для Т-комплекса, отличной от переносчика онТ-ДНК+VirD2. Очевидно, что в бактерии VirE2 «не видит» комплекс онТ-ДНК+VirD2, потому что, в противном случае, он бы немедленно к этому комплексу прикрепился. Следовательно, по окончании формирования комплекс Т-ДНК+VirD2 немедленно секретируется в растение. До сих пор остается неизвестным, в какой части растительной клетки (при прохождении через плазматическую мембрану, в цитоплазме, с наружной стороны ядра или внутри ядра) происходит формирование полного Т-комплекса. Можно лишь предполагать, что белок VirE2 либо встречает комплекс Т-ДНК+VirD2 у самого входа в растительную клетку, либо присоединяется к нему после попадания в ядро.

III.C. СРАВНЕНИЕ ПЕРЕНОСА Т-ДНК И БАКТЕРИАЛЬНОЙ КОНЬЮГАЦИИ

Механизм переноса Т-ДНК во многом сходен с системой конъюгативного переноса плазмиды широкого круга хозяев RP4, группа IncP (Lessl, Lanka, 1994; Winans et al., 1996). В обоих случаях имеется ориджин переноса (*oriT* при конъюгации и правая граница Т-ДНК при агротрансформации), а также сайт-специфическая эндонуклеаза, ответственная за инициацию переноса. Последовательности ориджинов сходны между собой и распознающие их ферменты также обладают консервативными мотивами на N-терминальных концах. В обоих случаях транспортной формой ДНК является одонитевая молекула, входящая в ДНК-белковый комплекс, в котором сайт-специфическая эндонуклеаза (TraI у RP4 и VirD2 у Ti-плазмиды) присоединена к 5'-концу онДНК. Более того, белки, составляющие канал для транспорта ДНК-белкового комплекса в реципиентную клетку, сходны по первичной последовательности и организации кодирующих генов (Tra2 и TraG в случае плазмиды RP4, VirB и VirD4 у Ti-плазмиды). Однако структура самого транспортного канала не идентифицирована ни для RP4, ни для Т-ДНК. По аналогии с F-системой конъюгативного переноса предполагается участие в транспорте ДНК структур типа пилей. Недавно обнаружено, что присутствие/отсутствие пилей коррелирует со способностью к обмену Т-ДНК между различными мутантами *A. tumefaciens*. На основании этого предполагается, что пили участвуют и в переносе Т-ДНК в растительные клетки (Fullner et al., 1996).

Различаются в двух системах переноса и реципиентные клетки: при бактериальной конъюгации ДНК передается в бактерии, а перенос Т-ДНК происходит в клетку растения. Кроме того, при бактериальной конъюгации ориджин переноса является одновременно и его терминирующей последовательностью, а его попадание в реципиентную клетку знаменует конец переноса. В реципиентной клетке перенесенная плазида восстанавливает кольцевую структуру и поддерживается экстрахромосомно или, при наличии гомологичной последовательности, встраивается в хромосому. В любом случае она сохраняет свою способность к дальнейшему переносу в другие бактерии.

В противоположность этому, при агробактериальной трансформации старт- и стоп-последовательности транспорта Т-ДНК расположены на разных ее границах (хотя в случае маленьких плазмид достаточно и одной пограничной последовательности) и процесс переноса не заканчивается попаданием Т-ДНК в цитоплазму растительной клетки. Т-ДНК далее переходит в растительное ядро и, поскольку она не может самостоятельно поддерживаться внутри клетки, то должна обязательно встроиться в растительный геном. Еще одним отличием является то, что Т-ДНК не кодирует белки, необходимые для собственного переноса и, таким образом, встраивание в растительный геном является необратимым процессом. И, наконец, при бактериальной конъюгации передаваемые в составе плазмиды гены экспрессируются как в доноре, так и в реципиенте, тогда как переносимые с помощью Т-ДНК гены обладают эукариотическими регуляторными элементами и работают только в реципиентных (растительных) клетках (табл. 1).

Таблица 1. Сходства и различия процессов переноса Т-ДНК и бактериальной конъюгации.

Свойство	Перенос Т-ДНК	Бактериальная конъюгация
Сходства		
Ориджин переноса	+ (границы)	+ (oriT)
транспортные белки, разрез, ковалентное присоединение	+	+
активность транспортных белков <i>in vitro</i>	+	+
транспортная форма – онДНК;	+	+ (во всех изученных случаях)
транспортный аппарат	+	+
Различия		
судьба перенесенной ДНК в реципиенте	интеграция по механизму незаконной рекомбинации	сайт-специфическая интеграция или экстрахромосомное состояние
транспорт в ядро	+	-
экспрессия генов переносимой ДНК в клетках донора	-	+
реципиент в результате переноса становится донором	-	+

IV. Перенос Т-комплекса в ядро растительной клетки

IV.A. ДОСТАВКА В ЯДРО

После попадания в растительную клетку Т-комплекс перемещается в ядро (рис. 1,С). Для этого в белках должны содержаться сигналы ядерной локализации (СЯЛ) (Garcia Bustos et al., 1991). СЯЛ – это последовательность, совершенно необходимая для попадания в ядро как собственно ядерных, так и цитоплазматических белков. Хотя не существует строгой консенсус-последовательности СЯЛ, они, как правило, богаты основными аминокислотами. Перенос в ядро происходит по механизму активного транспорта и может быть условно разделен на 2 этапа. Первый заключается в СЯЛ-зависимом присоединении переносимой молекулы к цитоплазматической стороне поры в ядерной мембране (Ядерные Поры - ЯП). Он определяется семейством растворимых белков с молекулярной массой 50-60 кДа, являющихся рецепторами СЯЛ и, одновременно, переносчиками внутрь ядра (Adam, 1995). По-видимому, взаимодействие комплекса СЯЛ-рецептор - СЯЛ-содержащий белок с ЯП осуществляется с помощью белка p97. Второй этап – энергозависимый перенос в ядро через ЯП (Gurlich, Mattaj, 1996). При этом работают малая ГТФ-аза Rap и белок NTF2. По одной из моделей переноса, Rap гидролизует ГТФ на периферии ЯП, в месте присоединения СЯЛ-содержащего белка. Этим белок направляется в центральный канал, где взаимодействие с аппаратом ЯП осуществляет NTF2.

Поскольку попадание Т-ДНК в растительную клетку определяется белком вирулентности VirD2 и, скорее всего, VirE2, их считали главными факторами ядерного транспорта Т-ДНК. Действительно, в их составе обнаружены короткие пептиды, соответствующие СЯЛ. Слияние этих пептидов с белками, в норме расположенными в цитоплазме, обеспечивало их перемещение в ядро (Herrera-Estrella et al., 1990; Tinland et al., 1992; Howard et al., 1992; Citovsky et al., 1992). Значение этих последовательностей для переноса онТ-ДНК было изучено на примере белка VirD2. Показано, что за попадание в ядро отвечает С-терминальный СЯЛ VirD2, тогда как количественный вклад VirD2 в ядерный транспорт зависел от растения и используемого метода (Shurvington et al., 1992; Rossi et al., 1993; Narasimhulu et al., 1996; Yoshikoka et al., 1996). Эти результаты пока-

зывают, что именно С-терминальный СЯЛ VirD2 направляет онТ-ДНК в растительное ядро. Вклад СЯЛов VirE2 в перенос Т-ДНК невозможно исследовать напрямую, поскольку мутации в этом домене влияют и на ДНК-связывающую активность белка (Citovsky et al., 1992). Показано, что функции, выполняемые VirE2, не зависят от СЯЛ VirD2 (Rossi et al., 1996), то есть их роли в ядерном транспорте Т-ДНК различны. Это означает, что за СЯЛ-зависимую доставку в ядро отвечает не VirE2, а VirD2. Не исключено, что VirE2 работает на втором этапе доставки Т-комплекса в ядро, а именно во время прохождения через поры в ядерной мембране.

Мы считаем маловероятной СЯЛ-зависимость работы VirE2 на этом этапе (что могло бы и являться различием в функциях СЯЛ VirE2 и VirD2), поскольку транспорт белков через ЯП, как правило, не зависит от СЯЛ. Кроме того, СЯЛ-домен VirE2 перекрывается с его ДНК-связывающим доменом (Citovsky et al., 1992) и, скорее всего, скрыт внутри комплекса онТ-ДНК+VirE2. По нашему мнению, вклад VirE2 в ядерный транспорт Т-комплекса заключается в растягивании комплекса с целью облегчения его прохождения сквозь ЯП (Citovsky et al., 1989). В соответствии с этим находятся результаты опытов по микроинъекции флуоресцентно-меченого комплекса онДНК+VirE2 в клетки тычиночных волосков *Tradescantia virginiana* (Zupan et al., 1996). Комплексы, содержащие интактный VirE2, накапливались в ядре. Без белка меченая ДНК оставалась в цитоплазме, а наличие VirE2 с частичной делецией N-терминального СЯЛ, уменьшающей ядерную локализацию белка, но сохраняющей до некоторой степени ДНК-связывающую активность, задерживало ядерный транспорт комплекса. Такой мутантный белок присоединяется к онДНК, но при связывании с ДНК не стимулируется присоединение оставшихся свободных молекул белка (non-cooperative binding), и, поэтому, он обнаруживается как в ядре, так и в цитоплазме. Возможно, что вследствие мутации, изменяется структура комплекса Т-ДНК+VirE2, что препятствует его пассивному импорту в ядро. Вероятен и другой вариант, в соответствии с которым изменения в СЯЛ VirE2 влияют на активный транспорт комплекса в ядро. Для окончательного выбора между этими альтернативами необходимо исследовать мутанты по гену *virE2*, с делецией СЯЛ, но с сохранением ДНК-связывающей активности на уровне белка дикого типа.

Процесс ядерного транспорта является важной составляющей в поддержании нормальной жизнедеятельности эукариотических клеток и, скорее всего, компоненты аппарата транспорта имеют общее происхождение у всех эукариот (Lake, Rivera, 1994). Структура ЯП, потребности в энергии на транспорт и в рецепторах к импортируемым белкам в целом консервативны у растений, позвоночных и дрожжей, однако обнаружены и различия. Так, модификации белков ЯП углеводами различаются у дрожжей и растений. Кроме того, некоторые ингибиторы ядерного транспорта, такие как зародышевый агглютинин пшеницы или N-этилмалеимид, блокируют ядерный транспорт только у позвоночных, но не у растений (Hicks, Raikhel, 1995). Состоящий из двух частей СЯЛ VirD2 может функционировать в растениях и дрожжах (Tinland et al., 1992). Однако очищенный и флуоресцентно-меченый белок VirE2 после инъекции в цитоплазму эмбрионов *Drosophila* или в ооциты *Xenopus* обнаруживается только в цитоплазме (Gurlanick et al., 1996). Это не удивительно, поскольку даже в растениях СЯЛ VirE2 работает на субоптимальном уровне (Citovsky et al., 1994). В результате модификаций структуры СЯЛ VirE2 в более подходящую консенсус-последовательность белок приобретает ядерную локализацию, как в клетках *Drosophila*, так и в ооцитах *Xenopus* (табл. 2). Было бы интересно изучить поведение такого мутантного белка в растениях, самого по себе и применительно к транспорту Т-ДНК.

IV.B. СРАВНЕНИЕ ПЕРЕНОСА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В СОСТАВЕ Т-КОМПЛЕКСА И ПРИ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Существуют две модельные системы для изучения транспорта нуклеиновых кислот в ядро — трансформация *A. tumefaciens* и вирусное заражение. У млекопитающих одним из примеров ядерного транспорта вирусной ДНК является перенос в ядро преинтеграционного комплекса вируса ВИЧ-1 (Goldfarb, 1995). После заражения клеток ВИЧ-1 вирусная ДНК в форме высокомолекулярного нуклеопротеинового комплекса попадает в ядро и встраивается в геном. Преинтеграционный ком-

Таблица 2. Сигналы ядерной локализации белков VirE2 и VirD2.

KRpRdrhgelggRKRaR	C-терминальный СЯЛ VirD2
KlRpedRyiqteKygR	VirE2
KtRygsdteiKlKsK	VirE2
KRtygsdteiKlKsK	модифицированный VirE2 (Gurlanick et al., 1996)
KRpaatkkggqK	СЯЛ нуклеоплазмина

плекс включает, помимо вирусной нуклеиновой кислоты, интегразу, белки матрикса, кодируемые геном *gag*, и обратную транскриптазу, кодируемую геном *pol*. Матриксные белки GAG вируса ВИЧ-1 содержат СЯЛы, которые обеспечивают попадание преинтеграционного комплекса в ядро (Burkinsky et al., 1993a). Находящаяся в его составе интегразы необходима для встраивания ретровирусной ДНК в хозяйскую ДНК (Farnet et al., 1991). Таким образом, в преинтеграционный комплекс ВИЧ-1 входят белки, необходимые для проникновения в ядро и встраивания вирусной ДНК.

У растений описана группа вирусов (геминивирuсы), нуклеиновая кислота которых представлена в одонитевой форме. Эти вирусы размножаются в ядре растительной клетки и, таким образом, на некоторых стадиях жизненного цикла им необходима система транспорта в ядро и из него. Показано, что один из вирусных белков, BR1, находится в ядре растительной клетки и присоединяется там к онДНК (Pascal et al., 1994). Через 30 минут после микроинъекции в клетки губчатого мезофилла табака флюоресцентно-меченая ДНК концентрируется в ядре. Последующая микроинъекция BR1 приводит к выходу ДНК из ядра (Nouéir et al., 1994). На основании этих результатов можно заключить, что вирусные белки необходимы только для экспорта ДНК из ядра, а проникновение вирусной ДНК в ядро происходит без их участия.

Примером другого вируса растений, который кодирует ядерный белок, является вирус гравировки табака, относящийся к группе потивирусов. Репликация вирусной РНК происходит в цитоплазме. Интересно, что вирусный СЯЛ-содержащий белок N1a присутствует в двух формах: первая располагается в ядре, а вторая - ковалентно присоединяется к вирусной РНК, находящейся в цитоплазме. Предполагается, что в цитоплазме белок N1a необходим для инициации синтеза РНК или для процессинга промежуточных продуктов этого синтеза, а относительно функций его ядерной фракции пока ничего не известно. Интересно отметить, что СЯЛы белка N1a перекрывают или располагаются очень близко от тирозина, определяющего ковалентное присоединение к 5'-концу РНК. Вероятнее всего, именно такое расположение доменов в белке супрессирует ядерный транспорт комплекса РНК-N1a (Carrington et al., 1991). Сходные данные получены для одного из N-терминальных СЯЛов VirD2. Слияние этого СЯЛа с репортерным белком приводит к его ядерной локализации (Tinland et al., 1992), но присутствие СЯЛа необязательно для попадания комплекса онДНК+VirD2 в ядро (Rossi et al., 1993). И в этом случае последовательность СЯЛа находится близко к тирозину, определяющему присоединение VirD2 к онТ-ДНК.

В отличие от потивируса табака, чья РНК все время остается цитоплазматической, у вируса гриппа РНК попадает в ядро (O'Neil et al., 1995). РНК вируса гриппа по всей длине взаимодействует с нуклеопротеином (НП). Только в его присутствии она способна к проникновению в ядро, тогда как свободная РНК локализуется в цитоплазме. Таким образом, транспорт РНК вируса гриппа в ядро определяется исключительно СЯЛом его нуклеопротеина.

Все эти примеры объединяет участие белков в транспорте вирусных нуклеиновых кислот между ядром и цитоплазмой. Более того, локализация свободного белка не всегда совпадает с локализацией этого же белка, но в комплексе с нуклеиновой кислотой. У 79% ядерных ДНК- или РНК-связывающих белков, для которых доказано наличие СЯЛ, его последовательность перекрывает

или располагается вблизи от ДНК-связывающего домена (LaCasse et al., 1995). Это соответствует функции большинства белков: они работают внутри ядра как, например, транскрипционные факторы, но не отвечают за доставку в ядро нуклеиновых кислот. Для выполнения последней роли необходимо, чтобы оба домена были физически разобщены, поскольку они функционируют одно и то же время.

Для ядерного экспорта и импорта белков предполагается наличие одного общего механизма но разных запускающих сигналов (Gerace, 1995). Удалось наблюдать экспорт специфичных премессенджерных рибонуклео-протеиновых частиц (РНП) через поры в ядерной мембране (Mehlin et al., 1995). Во время прохождения через пору частицы удлинялись, а направляющим являлся 5'-конец транскрипта. Вероятнее всего, лидерный конец распознается за счет структуры кэпа. По аналогии, агробактериальные белки вирулентности, входящие в Т-комплекс, могут направлять ядерный транспорт Т-ДНК. Механизм импорта Т-комплекса, с расположенным на его 5'-конце белком VirD2, по-видимому, соответствует механизму прохождения РНП через ЯП, однако в обратную сторону.

V. Интеграция Т-ДНК

V.A. РОЛЬ РАСТИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ

После попадания в ядро растительной клетки Т-ДНК встраивается в ее геном (рис. 1,D). Встраивание представляет собой вариант незаконной рекомбинации в случайные участки хромосом (Chyi et al., 1986; Wallroth et al., 1986; Gheysen et al., 1991; Mayerhofer et al., 1991; Tinland, Hohn 1995; Tinland, 1996). Показано, что Т-ДНК встраивается преимущественно в транскрипционно активные районы (Kopcz et al., 1989; Herman et al., 1990). Т-ДНК является единственным известным элементом, способным к проникновению в растительную клетку с последующей интеграцией в ядерный геном. Транспозоны растений передвигаются в пределах одной клетки и для своего движения нуждаются в ферменте, закодированном в перемещаемой ДНК. Более того, для эксцизии и реинтеграции транспозонам необходимы специфические последовательности, расположенные на концах молекулы ДНК. В отличие от них, Т-ДНК не контролирует собственное движение и не несет необходимых для встраивания последовательностей (границы Т-ДНК функционируют только в бактерии). Кроме того, после интеграции в хромосомы Т-ДНК более не перемещается. Некоторые аналоги процесса интеграции Т-ДНК имеются и животных. Как уже говорилось, ретровирусы, такие как ВИЧ-1, встраиваются в геном с помощью интегразы. Ретровирусная ДНК сходна с транспозонами тем, что она интегрирует сайт-специфично в отношении собственной, а не хозяйской, ДНК.

Как сказано выше, Т-ДНК попадает в растительные клетки в виде комплекса онТ ДНК+VirD2, а ядра достигает, по-видимому, дополнительно связанная еще и с белком VirE2. Поэтому важным является вопрос о наличии у этих белков функции интегразы, которая, как в случае ретровирусов, обеспечивает встраивание ДНК в геном. Для ответа на этот вопрос был сконструирован мутантный белок VirD2, при наличии которого встраивание Т-ДНК в геном нарушалось (Tinland et al., 1995). Мутация не сказывалась на эффективности транспорта Т-ДНК и не влияла на частоту встраивания, что говорит об отсутствии функции интегразы у белка VirD2. Отсутствие VirE2 также не влияло на эффективность встраивания Т-ДНК (Rossi et al., 1996). По-видимому, за эту функцию отвечают ферменты репарации растительной ДНК. Это подтверждают данные о том, что у мутантов арабидопсиса, гиперчувствительных к УФ-лучам или гамма-радиации, снижена способность к интеграции Т-ДНК (Sonti et al., 1996). Интеграция Т-ДНК, таким образом, принципиально отличается от интеграции ретровирусов.

С использованием в качестве зондов последовательностей, фланкирующих места встройки Т ДНК, были изолированы участки генома, в которые происходило встраивание. Их анализ показал, что в результате интеграции Т-ДНК происходят делеции растительной ДНК длиной 10-70 нуклеотидов. Значит, механизм незаконной рекомбинации Т-ДНК с растительной ДНК напоминает эксцизионную репарацию у дрожжей (Prakash et al., 1993) и человека (Hoeijmakers et al.

1994). В процессе эксцизионной репарации 3'- и 5'-концы разрезов соединяются, в результате чего в репарированной ДНК наблюдаются делеции коротких фрагментов. Интеграция Т-ДНК, по-видимому, происходит по этому же принципу (Tinland, Hohn, 1995; Tinland, 1996).

V.V. РОЛЬ БЕЛКОВ VIRD2 И VIRE2

Левая и правая границы Т-ДНК распознаются в *A. tumefaciens* белком VirD2. За счет этого белка образуется односторонний фрагмент ДНК определенной длины и состава. Путем клонирования и секвенирования участка генома, в который встроилась Т-ДНК, можно сравнить исходную последовательность с интегрировавшейся. Анализ последовательности у большого числа трансформантов позволил выявить общие закономерности встраивания Т-ДНК. Обнаружено, что независимо от растения-реципиента (арабидопсис или табак) последовательность 5'-конца Т-ДНК вплоть до нуклеотида, к которому ковалентно прикрепляется VirD2, практически всегда входит в состав встроившейся ДНК. Однако на левой границе Т-ДНК/растительная ДНК, как правило, обнаруживаются делеции в Т-ДНК (до 50 нуклеотидов). На основании этого предполагается, что VirD2 защищает 5'-конец Т-ДНК во время ее перемещения и интеграции в геном. И, действительно, VirD2 участвует в лигировании 5'-конца Т-ДНК с растительной ДНК (Tinland et al., 1995). Утрата этой функции не влияет на эффективность интеграции Т-ДНК, что предполагает независимость интеграции правого конца Т-ДНК от белка VirD2. Однако, именно конец, ассоциированный с VirD2 дикого типа, распознается растительными ферментами, осуществляющими встраивание Т-ДНК. Но поскольку этот этап не является решающим, было высказано предположение о том, что 3'-конец онТ-ДНК участвует в поиске гомологии с растительной ДНК и осуществляет ее первый синапсис Т-ДНК, после чего происходит лигирование самого крайнего нуклеотида на 5'-конце, защищенном VirD2, с 3'ОН-концом растительной ДНК (Tinland et al., 1995; Tinland, 1996; рис. 2).

Как было сказано ранее, в отсутствие VirE2 в геноме растения обнаруживаются сильно поврежденные копии Т-ДНК, однако, как и в случае VirD2, эффективность самого встраивания не нарушается. Таким образом, наиболее вероятными функциями VirE2 является защита онТ-ДНК и, возможно, транспорт ее в ядро. Эффективность трансформации *A. tumefaciens*, в целом, определяется координированными действиями VirD2 и VirE2 в защите молекулы Т-ДНК от нуклеаз и в ее точной доставке в ядро растительной клетки.

VI. Горизонтальный перенос генов

Под горизонтальным переносом генов подразумевают передачу генетического материала из одного организма в другой с последующей стабилизацией в реципиенте. Такой тип обмена генетической информацией хорошо изучен у прокариот, но можно обнаружить геномный обмен и между про- и эукариотами: между *E. coli* и дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* (Heinemann, Sprague, 1989; Nishikawa et al., 1992), между *A. tumefaciens* и растениями или дрожжами (Bundock et al., 1995; Piers et al., 1996). Интересно, что механизмы передачи конъюгативных плазмид от *E. coli* к дрожжам и бактериальной конъюгации сходны. Этот перенос не определяется специальной бактериальной системой транспорта, поскольку в дрожжевые клетки могут быть перенесены две плазмиды, принадлежащие к разным группам несовместимости (Heinemann, Sprague, 1989; Nishikawa et al., 1992).

В отличие от обмена, происходящего между *E. coli* и дрожжами, агробактерии используют весьма специфический механизм доставки конкретного участка ДНК в растительные клетки. Механизм переноса Т-ДНК имеет сходство с бактериальной конъюгацией и, по-видимому, эволюционно связан с ней (раздел III.С.). Эту гипотезу подтверждает то, что белки *vir*-района Ti-плазмиды агробактерий, в норме необходимые для переноса Т-ДНК в растение, могут направлять передачу плазмиды IncQ и между агробактериями (Beijersbergen et al., 1992). Единственным отличием переноса ДНК из агробактерии в растение от межбактериального обмена является зависимость от белка VirE2. Этот белок не нужен для транспорта плазмиды IncQ между бактериями, что предполагает либо наличие другого белка, связывающего ДНК в клетках донора или реципиента, либо возможность действия VirE2 только в условиях растительной клетки.

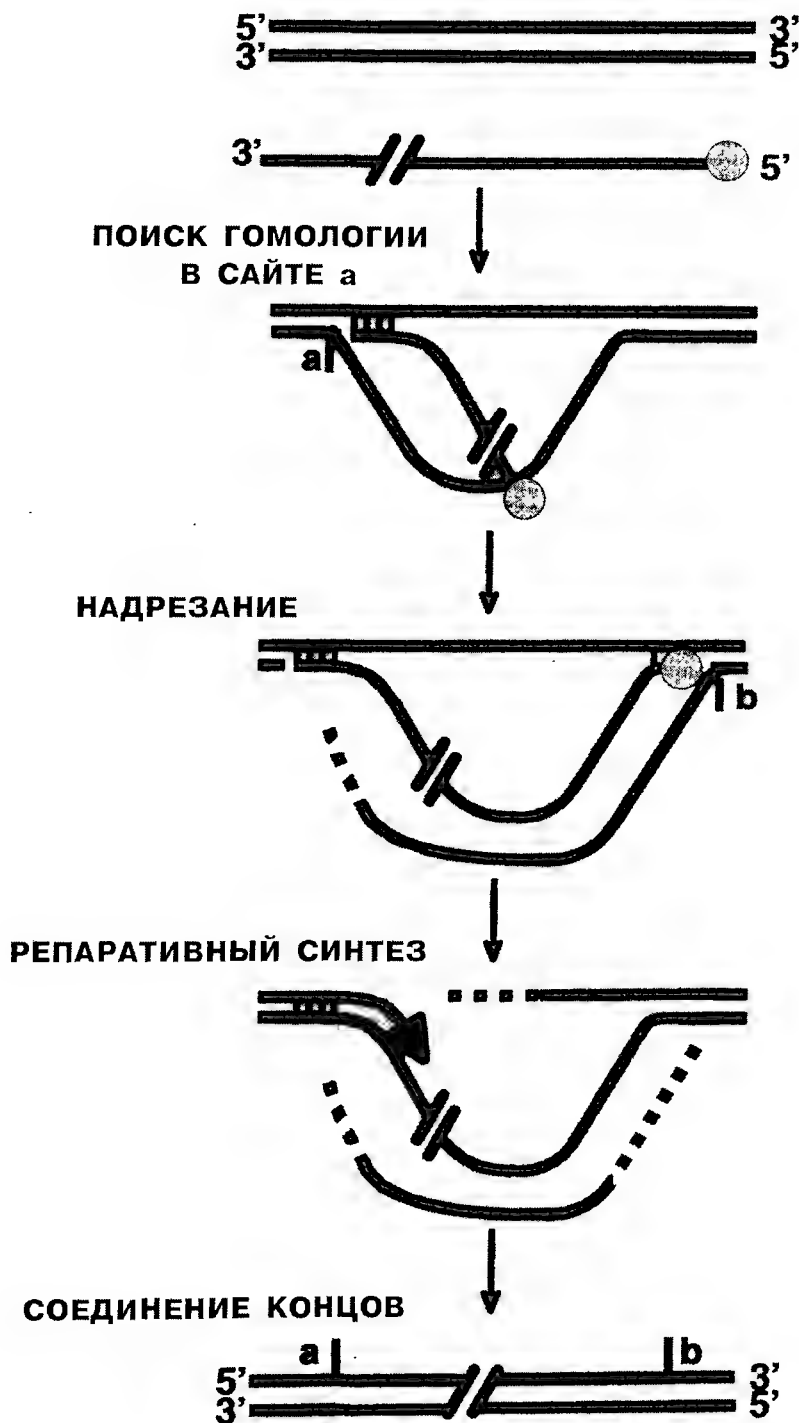


Рисунок 2. Механизм интеграции Т-ДНК (модель однострессовой Т-ДНК).

Перенос Т-ДНК в *S. cerevisiae* также зависит от *vir*-генов Ti-плазмиды (Bundock et al., 1995; Piers et al., 1996). Их роль при трансформации дрожжей очень сходна с таковой при трансформации растений. По-видимому, при трансформации дрожжей не задействованы только функции прикрепления агробактерии к растительным клеткам (Piers et al., 1996). Перенос Т-ДНК в дрожжи также зависит от белков VirB и VirD4, что подтверждает предположение об их участии в формировании аппарата для переноса Т-ДНК между *A. tumefaciens* и реципиентной клеткой. Интересно, что С-концевой домен белка VirD2, содержащий СЯЛ, существенен при трансформации дрожжей (Bundock et al., 1995), что соответствует данным об активности СЯЛов VirD2 в дрожжевых клетках (Tinland et al., 1992). В отличие от трансформации растений, эффективность агротрансформации дрожжей при выключении гена *virE2* за счет инсерции транспозона в кодирующий район снижается только в 10 раз. Это свидетельствует о меньшей роли VirE2 в переносе Т-ДНК в дрожжевых клетках по сравнению с растительными клетками, что может быть связано с различиями реципиентов в количестве нуклеаз и/или в аппарате ядерного транспорта.

Показано, что основным способом интеграции любой чужеродной ДНК в дрожжевой геном является гомологичная рекомбинация. Т-ДНК встраивается по механизму незаконной рекомбинации в случайные участки генома лишь при полном отсутствии гомологии с дрожжевой ДНК (Bundock, Нооукаас, 1996). В отличие от дрожжей, у растений незаконная рекомбинация является главным способом встраивания Т-ДНК и только в редких случаях оно происходит путем гомологичной рекомбинации (Puchta, Hohn, 1996). Эти различия подтверждают гипотезу о том, что интеграцию Т-ДНК осуществляют ферменты хозяйской (чаще растительной), но не бактериальной клетки.

В качестве естественных хозяев для *A. tumefaciens* выступает большое число видов двудольных растений. Однако посредством агроинфекции Т-ДНК может быть перенесена и в однодольные растения (Grimsley et al., 1987). К настоящему моменту с помощью *A. tumefaciens* удалось получить трансгенные растения риса (Hiei et al., 1994) и кукурузы (Ishida et al., 1996). Оказалось, что характер интеграции Т-ДНК у двудольных и однодольных сходен (рис. 3), что говорит об участии одной и той же группы ферментов в контроле встраивания Т-ДНК у растений разных классов. Таким образом, аппарат переноса Т-ДНК *A. tumefaciens* (белки VirB и VirD4) может быть использован для доставки ДНК в агробактериальные, а также дрожжевые и растительные клетки (рис. 4).

VII. Перспективы исследований

Некоторые белки вирулентности агробактерий перемещаются отдельно и/или вместе с Т-ДНК в растительные клетки, где прямо или косвенно выполняют функции, важные для транспорта Т-ДНК в ядро и интеграции в растительный геном. В этой главе мы акцентировали внимание на белках VirE2 и VirD2, однако у нас нет информации о других белках агробактерий, работающих в растительных клетках, которые были бы необходимы для нормальной жизнедеятельности *A. tumefaciens* и, одновременно, для транспорта Т-ДНК. Мы не знаем также, как белки вирулентности проводят Т-ДНК сквозь границы бактериальной и растительной клеток. К вопросам, на которые пока не найден ответ, относится и способ достижения растительного ядра: двигаются ли Т-комплексы вдоль элементов цитоскелета к порам в ядерной мембране; взаимодействуют ли белки вирулентности, такие как VirE2 и VirD2, с цитоскелетом, как это было показано для белка-переносчика вируса табачной мозаики (Heinlein et al., 1995). Важным является вопрос о том, зависит ли попадание белка VirE2 в растительную клетку от комплекса Т-ДНК+VirD2. Где и когда VirE2 присоединяется к этому комплексу? Здесь следует отметить, что до сих пор ни один из белков, обеспечивающих транспорт ДНК в растительную клетку, не был в ней физически локализован.

Каким образом Т-комплекс взаимодействует с системой ядерного импорта? Какие белки-интегрины вовлечены в процесс доставки Т-ДНК в ядро? Действительно ли VirD2 играет определяющую роль в распознавании пор в ядерной мембране, доставке Т-ДНК к ним и проведении сквозь них? Находятся ли СЯЛы VirE2 на поверхности комплекса или (как мы предполагаем) функцией этого белка является, помимо защиты Т-ДНК, придание такой формы Т-комплексу, при которой ни заряды, ни закрученность гибкого однонитевого филамента не мешают транс-

порту в ядро? Для решения этих вопросов, помимо всего прочего, должны быть использованы методы электронной микроскопии, а также смоделированный *in vitro* аппарат ядерного импорта (Merckle et al., 1996; Hicks et al., 1996) и дигибридная система дрожжей.

Само по себе изучение интеграции Т-ДНК в растительный геном имеет огромное значение для биологии в целом и для разработки прикладных технологий. Т-комплекс доставляется в ядро как вирусоподобная частица, у которой 5'-конец защищен белком VirD2, а остальная часть онТ-ДНК - белком VirE2. VirE2 должен покинуть комплекс перед или во время интеграции Т-ДНК, когда фосфотирозиновая связь VirD2 замещается фосфолиэфирной связью между Т-ДНК и растительной ДНК. Неизвестно, в какой форме (одно- или двунитевой) Т-ДНК интегрирует в геном растения, но инвертированные повторы, часто обнаруживаемые у трансформантов (de Neve et al., 1997), предполагают образование двунитевой Т-ДНК перед лигированием и интеграцией. Несомненно, что такие молекулы Т-ДНК, к началу лигирования уже должны быть освобождены от оболочки из VirE2.

Для анализа энзимологии интеграции Т-ДНК необходимо использовать разные подходы. Так, дигибридная система дрожжей поможет выявить белки, взаимодействующие с белковыми компонентами Т-комплекса. Полезным будет анализ встраивания Т-ДНК *in vitro* с использованием растительных экстрактов и какой-либо модельной растительной ДНК в качестве аналога Т-комплекса. В качестве дополнительного подхода можно предложить изучение чувствительных к излучению экотипов или мутантов растений, у которых специфически блокирована интеграция Т-ДНК (Sonti et al., 1995; Nam et al., 1997).

Вопросом, возможно и не имеющим отношения к функциям белков вирулентности в растительной клетке, является то, как Т-ДНК «выбирает» сайт встраивания. Поскольку трансформированные растения отбирают по экспрессии маркерных генов, расположенных на Т-ДНК, среди многих потенциальных сайтов-мишеней мы можем зафиксировать только транскрипционно активные (Koncz et al., 1989). А можно ли найти молчащие Т-ДНК? Существует множество доказательств сайленсинга (молчания) Т-ДНК, особенно при наличии повторов в сайте встраивания Т-ДНК, при одновременном встраивании нескольких копий Т-ДНК или в случае одинаковой пары трансген/эндогенный ген (Matzke, Matzke, 1995). Однако означает ли это, что Т-ДНК встраивается в молчащие последовательности? Поскольку обычно растительная ДНК существует не в виде химически чистой молекулы, а в виде хроматина, правомерен вопрос о связи между предпочтительными сайтами встраивания и структурой хроматина. На какой стадии клеточного цикла хроматин наиболее доступен для интеграции Т-ДНК (Villemont et al., 1997) и нужны ли уже собранные репликационные, репарационные или транскрипционные комплексы для эффективной интеграции?

И наконец, особые требования, касающиеся разработки методов трансформации, должны быть предъявлены к полевой и лабораторной работе биотехнологов растений. Это необходимо для того, чтобы обеспечить встройку только единичных копий Т-ДНК. Точная интеграция и весьма конкретный уровень экспрессии трансгенов, зависящий от числа встроившихся копий, являются обязательными условиями для легализации трансгенных растений. Возможно, манипуляции с генами вирулентности агробактерий, такими как *virE2* и *virD2*, станут одним из способов решения данной проблемы. Подробное изучение механизмов регуляции активности *vir*-генов будет способствовать также разработке эффективных методик инсерционного мутагенеза, большая потребность в которых имеется уже сейчас.

VIII. Благодарности

Мы признательны за критику и помощь в написании главы нашим неутомимым сотрудникам. Мы благодарны многим коллегам, предоставившим неопубликованный материал; среди них Ясунори Мачида, Уолт Риам, Анат Дас, Стэнтон Гелвин и Поль Хойкаас.

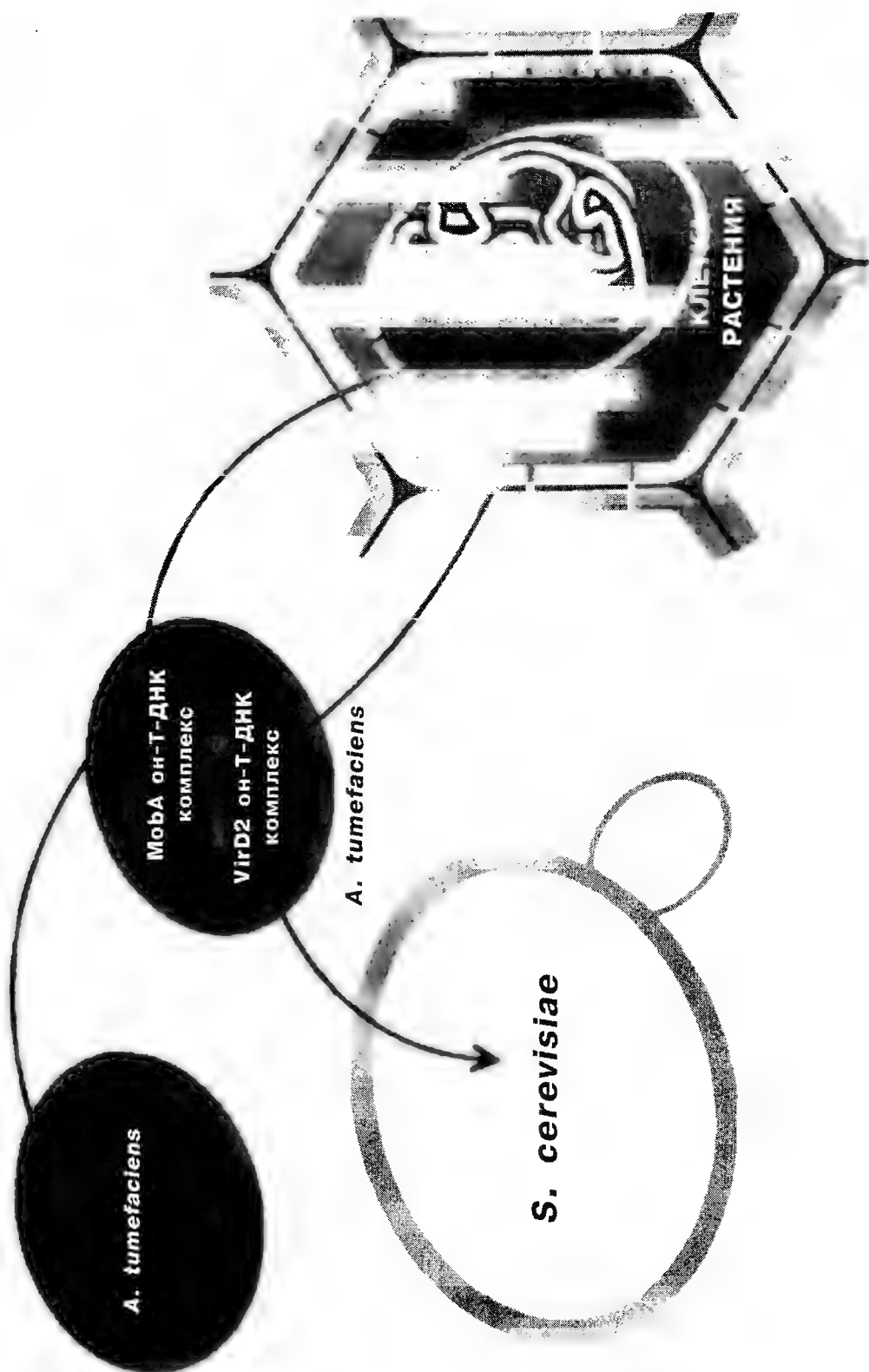


Рисунок 4. Возможности горизонтального переноса генов с помощью транспортной системы агробактерий.

IX. Литература

- Adam S.A. (1995) *Trends in Cell. Biol.* V. 5, p. 189-191.
- Beijersbergen A., Den Dulk-Ras A., Schilperoort R.A., Hooikaas P.J.J. (1992) *Science*. V. 256, p. 1324-1327.
- Berger B.R., Christie P.J. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 1723-1734.
- Binns A., Reaupre C., Dale E.M. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 4890-4899.
- Buchanan-Wollaston V., Passiatore J.E., Cannon F. (1987) *Nature*. V. 328, p. 172-175.
- Bukrinsky M., Sharova N., McDonald T., Pushkaraskaya T., Tarpley W.G., Stevenson M. (1993a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 90, p. 6125-6129.
- Bukrinsky M., Haggerty S., Dempsey M., Sharova N., Adzhubel A., Spitz L., Lewis P., Goldfarb D., Emermen M., Stevenson M. (1993b) *Nature*. V. 365, p. 666-668.
- Bundock P., den Dulk-Ras A., Beijersbergen A., Hooikaas P.J.J. (1995) *EMBO J.* V. 14, p. 3206-3214.
- Bundock P., Hooikaas P.J.J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 93, p. 15272-15275.
- Carrington J.C., Freed D.D., Leinicke A.J. (1991) *The Plant Cell*. V. 3, p. 953-962.
- Christie P.J. (1997) *J. Bacteriol.* V. 179, p. 3085-3094.
- Christie P.J., Ward Jr. J.E., Gordon M.P., Nester E.W. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 86, p. 9677-9681.
- Christie P.J., Ward J.E., Winans S.C., Nester E.W. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 2659-2667.
- Chyi Y.-S., Jorgensen R.A., Goldstein D., Tanksley S.D., Loaiza-Figueroa F.L. (1986) *Mol. Gen. Genet.* V. 204, p. 64-69.
- Citovsky V., de Vos G., Zambryski P. (1988) *Science*. V. 240, p. 501-504.
- Citovsky V., Warnick D., Zambryski P. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 91, p. 3210-3214.
- Citovsky V., Wong M.L., Zambryski P. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 86, p. 1193-1197.
- Citovsky V., Zupan J., Warnick D., Zambryski P. (1992) *Science*. V. 256, p. 1802-1805.
- Dale E.M., Binns A.N., Ward J.E. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 887-891.
- Das A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 85, p. 2909-2913.
- De Neve M., De Buck S., Jacobs A., Van Montagu M., Depicker A. (1997) *Plant J.* V. 11, p. 15-29.
- Durrenberger F., Cramer A., Hohn B., Koukolikova-Nicola Z. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 86, p. 9154-9158.
- Escudero J., Neuhaus G., Hohn B. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 92, p. 230-234.
- Farnet C., Haseltine W. (1991) *J. Virol.* V. 65, p. 1910-1915.
- Fullner J.K., Lara J.C., Nester E.W. (1996) *Science*. V. 273, p. 1007-1009.
- Fullner J.K., Stephens K.M., Nester E.W. (1994) *Mol. Gen. Genet.* V. 245, p. 704-715.
- Garcia Bustos J., Heitman J., Hall M.N. (1991) *Biochem. Biophys. Acta Rev.* V. 1071, p. 83-101.
- Gardner R.C., Knauf V.C. (1986) *Science*. V. 231, p. 725-727.
- Gerace L. (1995) *Cell*. V. 82, p. 341-344.
- Gheysen G., Villarroel R., van Montagu M. (1991) *Genes & Dev.* V. 5, p. 287-297.
- Gietl C., Koukolikova-Nicola Z., Hohn B. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 84, p. 9006-9010.
- Goldfarb D.S. (1995) *Curr. Biol.* V. 5, p. 570-573.
- Gorlich D., Mattaj J.W. (1996) *Science*. V. 271, p. 1513-1518.
- Grimsley N., Hohn T., Davies J.W., Hohn B. (1987) *Nature*. V. 325, p. 177-179.
- Gurlanick B., Thomsen G., Citovsky V. (1996) *The Plant Cell*. V. 8, p. 363-373.
- Hamilton C.M., Frary A., Lewis C., Tanksley S.D. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 93, p. 9975-9979.
- Heineman J.A., Sprague Jr. G.F. (1989) *Nature*. V. 340, p. 205-209.
- Heinlein M., Epel B.L., Padgett H.S., Beachy R.N. (1995) *Science*. V. 270, p. 1983-1985.
- Herman L., Jacobs A., Van Montagu M., Depicker A. (1990) *Mol. Gen. Genet.* V. 224, p. 248-256.
- Herrera-Estrella A., Van Montagu M., Wang K. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 87, p. 9534-9537.
- Hicks G., Raikhel N. (1995) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* V. 11, p. 155-188.
- Hicks G.R., Smith H.M., Lobreaux S., Raikhel N.V. (1996) *Plant Cell*. V. 8, p. 1337-1352.
- Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. (1994) *Plant J.* V. 6, p. 271-282.
- Hoeijmakers J.H.J., Bootsma D. (1994) *Nature*. V. 371, p. 654-655.
- Hooikaas P.J.J., Den Dulk-Ras H.M., Schilperoort R.A. (1984) *Plasmid*. V. 11, p. 195-205.
- Howard E.A., Zupan J.R., Citovsky V., Zambryski P.C. (1992) *Cell*. V. 68, p. 109-118.
- Ishida Y., Saito H., Ohta S., Hiei Y., Komari T., Kumashiro T. (1996) *Nature Biotechnol.* V. 14, p. 745-750.
- Koncz C., Martini N., Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Kurber H., Redei G.P., Schell J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 86, p. 8467-8471.
- Koukolikova-Nicola Z., Raineri D., Stephens K., Ramos C., Tinland B., Nester E.W., Hohn B. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 723-731.
- La Casse E.C., Lefebvre Y.A. (1995) *Nucl. Acids Res.* V. 23, p. 1647-1656.
- Lake, Rivera (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 91, p. 2880-2881.
- Lartey R., Citovsky V. (1997) *Gen. Eng. Princ. Meth.* V. 19, p. 201-214.
- Lessl M., Lanka E. (1994) *Cell*. V. 77, p. 321-324.
- Lin T.-S., Kado C.I. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 9, p. 803-812.
- Matzke M.A., Matzke A.J.M. (1995) *Plant Physiol.* V. 107, p. 6679-6685.
- Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Nawrath C., Bakkeren G., Cramer A., Angelis A., Redei G.P., Schell J., Hohn B., Koncz C. (1991) *EMBO J.* V. 10, p. 697-704.

- Mehlin H., Daneholt B., Skoglund U. (1992) *Cell*. V. 69, p. 605-613.
- Mehlin H., Daneholt B., Skoglund U. (1995) *J. Cell. Biol.* V. 129, p. 1205-1216.
- Melchers L.S., Maroney M.J., den Dulk-Ras A., Thompson D.V., van Vuuren H.A.J., Schilperoort R.A., Hooykaas P.J.J. (1990) *Plant Mol. Biol.* V. 14, p. 249-259.
- Merkle T., Leclerc D., Marshallsay C., Nagy F. (1996) *Plant J.* V. 10, p. 1177-1186.
- Nam J., Matthysse A.G., Gelvi S.B. (1997) *Plant Cell*. V. 9, p. 317-333.
- Narasimhulu S.B., Deng X., Sarria R., Gelvin S.B. (1996) *The Plant Cell*. V. 8, p. 873-886.
- Nishikawa M., Suzuki K., Yoshida K. (1992) *Curr. Genet.* V. 21, p. 101-108.
- Nouairy A.O., Lucas W.J., Gilbertson R.L. (1994) *Cell*. V. 76, p. 925-932.
- Offen L., De Greve H., Leemans J., Hain R., Hooykaas P.J.J., Schell J. (1984) *Mol. Gen. Genet.* V. 195, p. 159-163.
- O'Neill R., Jaskunas R., Blobel G., Palese P., Moroianu J. (1995) *J. Biol. Chem.* V. 270, p. 22701-22704.
- Pansegau W., Schoumacker F., Hohn B., Lanka E. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 90, p. 11538-11542.
- Pascal E., Sanderfoot A.A., Ward B.M., Medville R., Turgeon R., Lazarowitz S.G. (1994) *The Plant Cell*. V. 6, p. 995-1006.
- Piers K.L., Heath J.D., Liang X., Stephens K.M., Nester E.W. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 93, p. 1613-1618.
- Prakash S., Sung P., Prakash L. (1993) *Annu. Rev. Genet.* V. 27, p. 33-70.
- Puchta H., Hohn B. (1996) *Trends Plant Sci.* V. 1, p. 340-348.
- Regensburg-Tuink A.J.G., Hooykaas P.J.J. (1993) *Nature*. V. 363, p. 69-71.
- Rossi L., Hohn B., Tinland B. (1993) *Mol. Gen. Genet.* V. 239, p. 345-353.
- Rossi L., Hohn B., Tinland B. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 93, p. 126-130.
- Scheffele P.R., Pansegau W., Lanka E. (1995) *J. Biol. Chem.* V. 270, p. 1269-1276.
- Sen P., Pazour G.J., Anderson D., Das A. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 2573-2580.
- Shurvinton C.E., Hodges L., Ream W. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 89, p. 11837-11841.
- Sonti R., Chiurazzi M., Wong D., Davies C., Harlow G., Mount D. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 92, p. 11786-11790.
- Stachel S.E., Nester E.W., Zambryski P.C. (1986a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 83, p. 379-383.
- Stachel S.E., Timmerman B., Zambryski P. (1986b) *Nature*. V. 322, p. 706-712.
- Sundberg C., Meek L., Carroll K., Das A., Ream W. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 1207-1212.
- Sweet D.J., Gerace L. (1995) *Trends in Cell Biol.* V. 5, p. 444-447.
- Tinland B. (1996) *Trends Plant Sci.* V. 1, p. 178-184.
- Tinland B., Hohn B. (1995). In: *Genetic Engineering, Principles and Methods*. Setlow J.K. (ed.) Plenum New York 17, p. 209-229.
- Tinland B., Hohn B., Puchta H. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 91, p. 8000-8004.
- Tinland B., Koulikova-Nicola Z., Hall M.N., Hohn B. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 89, p. 7442-7446.
- Tinland B., Schoumacker F., Gloeckler V., Bravo Angel A.M., Hohn B. (1995) *EMBO J.* V. 13, p. 5764-5771.
- Villemont E., Dubois F., Sangwan D.R., Vasseur G., Bourgeois Y., Sangwan-Norreel. (1997) *Planta*. V. 201, p. 160-172.
- Vogel A.M., Das A. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 303-312.
- Wallroth M., Gerats A.G.M., Rogers S.G., Fraley R.T., Horsch R.B. (1986) *Mol. Gen. Genet.* V. 202, p. 6-15.
- Ward E.R., Barnes W.M. (1988) *Science*. V. 242, p. 927-930.
- Ward J.E., Dale E.M., Christie P.J., Nester E.W., Binns A.N. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 5187-5199.
- Winans S.C., Burns D.L., Christie P.J. (1996) *Trends Microbiol.* V. 4, p. 64-68.
- Wirawan I.G.P., Kojima M. (1996) *Biosci. Biotech. Biochem.* V. 60, p. 44-49.
- Yoshioka Y., Takahashi Y., Matsuoka K., Nakamura K., Koizumi J., Kojima M., Machida Y. (1996) *Plant and Cell Physiol.* V. 37, p. 782-789.
- Young C., Nester E.W. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 3367-3374.
- Yusibov V.M., Steck T.R., Gupta V., Gelvin S.B. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 91, p. 2994-2998.
- Zupan J., Citovsky V., Zambryski P. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 93, p. 2392-2397.

Факторы хозяйской специфичности *Agrobacterium*

Денг В., Нестер Ю.

I.	Введение.....	345
II.	Ti-плазмиды и хозяйская специфичность.....	346
	II.A. <i>vir</i> -гены и хозяйская специфичность.....	347
	II.A.1. Индукция генов <i>virA</i> и <i>virG</i>	347
	II.A.2. Гены <i>virE</i> и <i>virC</i>	348
	II.A.3. Ti-специфичные гены: <i>virF</i> , <i>pinF</i> (<i>virH</i>), <i>tzs</i> и <i>virJ</i>	348
	II.B. T-ДНК и хозяйская специфичность.....	351
	II.B.1. Гены, входящие в состав T-ДНК.....	351
	II.B.2. Границы T-ДНК.....	352
	II.B.3. Некротическая реакция.....	352
III.	Хромосомные детерминанты хозяйской специфичности	353
	III.A. Гены, влияющие на хозяйскую специфичность.....	353
	III.A.1. Гены, контролирующие взаимодействие с растением.....	353
	III.A.2. Гены, влияющие на экспрессию <i>vir</i> -генов или перенос T-ДНК.....	354
	III.B. Взаимодействие между генами хромосомы и Ti-плазмиды при определении хозяйской специфичности.....	355
	III.B.1. Феномен «супервирулентности».....	356
	III.B.2. Штаммы, специфичные для винограда.....	357
IV.	Растительные факторы, определяющие специфичность агробактерий.....	357
V.	Агротрансформация однодольных и других устойчивых растений: проблемы и успехи.....	358
VI.	Заключение.....	360
VII.	Литература.....	360

I. Введение

Круг хозяев *Agrobacterium* spp. чрезвычайно широк по сравнению с другими патогенными для растений бактериями или с *Rhizobium* spp. Путем искусственного заражения агробактериями можно индуцировать опухолообразование у большинства двудольных, у ряда голосеменных и у некоторых однодольных растений (De Cleen, De Ley, 1976; De Cleen, 1985; Smith, Hood, 1995). Однако в естественных условиях круг хозяев агробактерий более узок, чем в искусственных. Так, заметный экономический ущерб наблюдается при формировании корончатых галлов у винограда, плодовых деревьев, древесных видов ореха и некоторых декоративных растений (Kerr, 1992). Подходящее для агробактерии растение-хозяин традиционно выявлялось по формированию опухоли в ответ на заражение, однако оказалось, что у некоторых растений, например, у однодольных, опухоль не образуется, хотя перенос T-ДНК и ее интеграция в геном происходят нормально. Такие растения предложено называть «молчащими хозяевами» (Jarchow et al., 1991). В этой главе мы не делаем различий между естественно и искусственно выявленными хозяевами агробактерий, за исключением специально оговоренных случаев. Любое растение, которое может быть инфицировано *Agrobacterium* spp. и в геном которого встраивается T-ДНК, рассматривается как хозяин.

Способность агробактерий заражать широкий круг растений удивительна, если представить сложность и многоэтапность процесса опухолеобразования, связанного с переносом Т-ДНК. Возможность переноса Т-ДНК из агробактерий в дрожжи в лабораторных условиях (Bundock et al., 1995; Piers et al., 1996) свидетельствует о том, что в процессе переноса Т-ДНК используются фундаментальные свойства эукариотических клеток. Кроме того, это говорит о консервативности хозяйских факторов, вовлеченных в процесс трансформации, и о наличии особых, пока еще не выявленных путей преодоления агробактериями защитных реакций растений. Однако отдельные изоляты *Agrobacterium* все же различаются кругом хозяев, и даже штаммы с широкой хозяйской специфичностью (ШХС-штаммы) не могут индуцировать опухоли на всех растениях. Определенные виды растений, в том числе большинство хозяйственно-ценных злаков и бобовых, вообще не способны к опухолеобразованию.

Ограничения хозяйской специфичности *Agrobacterium* spp. определяются многими причинами (Binns, Tomashow, 1988; глава 12). Во-первых, перенос Т-ДНК может не осуществляться в случаях: 1) плохого роста и/или выживаемости бактерий в ранке растения, 2) отсутствия индукторов *vir*-генов или сайтов прикрепления бактерий к растительной клетке, 3) мутаций в *vir*-генах, приводящих к дефектам процессинга или транспорта Т-ДНК. Далее, при нормально проходящем переносе опухоль может не образоваться из-за неспособности Т-ДНК к интеграции в геном растения, потери части генов Т-ДНК, слабой или чересчур интенсивной экспрессии генов Т-ДНК. Реакция разных растений на трансформацию может быть следствием различий в балансе фитогормонов, поскольку чувствительность к изменениям их уровня варьирует. Специфичность *Agrobacterium* spp. к растениям может проявляться на видовом и, иногда, на генотипическом (сортовом) уровнях, она может быть связана с физиологическими или анатомическими особенностями растений. Некоторые растения могут быть нечувствительны к гормональным стрессам, которые возникают при экспрессии Т-ДНК, и поэтому не формируют опухолей, а другие могут обладать повышенной чувствительностью, и у них в ответ на заражение развиваются некрозы. Реакция на трансформацию *Agrobacterium* spp. может зависеть и от стадии развития растения, на которой произошло заражение. Таким образом, тип Ti(Ri)-плазмиды, хромосомный фон бактерии и взаимодействие между хромосомой и плазмидой, а также свойства растений вносят свой вклад в ограничения специфичности взаимодействия. Как будет показано ниже, вклад многих бактериальных факторов достаточно подробно изучен, тогда как растительные детерминанты еще мало известны.

II. Ti-плазмиды и хозяйская специфичность

Хотя род *Agrobacterium* в целом и некоторые штаммы в отдельности характеризуются очень широким кругом растений-хозяев (De Cleen, De Ley, 1976), у индивидуальных штаммов и изолятов хозяйская специфичность, как правило, ограничена (Anderson, Moore, 1979). Очень узким кругом растений-хозяев характеризуются некоторые штаммы *A. vitis*, выделенные из опухолей винограда (Panagopoulos, Psallidas, 1973). Ранние исследования показали, что у трансконъюгантов с разными Ti-плазмидами или хромосомным фоном хозяйская специфичность передавалась с плазмидой (Loper, Kado, 1979; Thomashow et al., 1980; Knauf et al., 1982). Дальнейшие исследования показали, что в определении хозяйской специфичности *Agrobacterium* играют роль ряд локусов Ti-плазмиды, влияющих либо на эффективность индукции *vir*-генов, процессинга или переноса Т-ДНК, либо на структуру Т-ДНК. Поскольку разные растения обладают различной способностью к образованию корончатых галлов, мы будем руководствоваться общим правилом, по которому любой ген агробактерий считается потенциальным детерминантом хозяйской специфичности, если мутации в нем ослабляют (но не прерывают окончательно) способность бактерии заражать любое растение.

II.A. *VIR*-ГЕНЫ И ХОЗЯЙСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

II.A.1. Индукция генов *virA* и *virG*

Одним из самых ранних этапов опухолеобразования, индуцируемого агробактериями, является обнаружение поранения на растении. За распознавание и восприятие сигнальных растительных молекул и за индукцию *vir*-генов отвечает двухкомпонентная система VirA/G (глава 13). Белок VirA, расположенный на внутренней мембране, чувствителен к специфическим фенольным компонентам и к изменениям внешних условий. Генетические опыты показали, что VirA непосредственно связывается с фенольными компонентами (Lee et al., 1995), так же как и белок NodD ризобий, воспринимающий флавоноиды и регулирующий экспрессию специфичных для клубенькообразования генов (Horvath et al., 1987; Spaink et al., 1987; глава 19). Следует отметить, что белки VirA разных агробактериальных штаммов, по-видимому, предпочтительно воспринимают разные фенольные компоненты (Lee et al., 1995). Поскольку многообразие, количество и соотношение фенольных соединений, экскретируемых растениями при поранении, варьирует в зависимости от вида, вполне допустимо, что ген *virA* каждого штамма «решает», какое растение подходит для заражения, как это происходит в случае гена *nodD* ризобий (Long, 1989).

Действительно, у некоторых агробактериальных штаммов ген *virA*, по-видимому, является основным детерминантом хозяйской специфичности. Об этом говорят данные, полученные при изучении штаммов *A. vitis* с узкой хозяйской специфичностью (УХС-штаммы): они взаимодействуют почти исключительно с виноградом и дополнительно способны вызывать образование опухолей лишь у одного или немногих дополнительных хозяев (Panagopoulos et al., 1978; Knauf et al., 1982). У одного из таких штаммов, Ag162, количество потенциальных хозяев может быть расширено за счет введения гена *virA* из ШХС-штамма (Yanofsky et al., 1985a). Показано, что в отличие от ШХС-штаммов, *vir*-гены штамма Ag162 не индуцируются ацетосирингоном в физиологически нормальных концентрациях, что обусловлено геном *virA* (Leroux et al., 1987). Даже при очень высоком содержании ацетосирингона эффективность индукции *vir*-генов УХС-штаммов низка (Spencer et al., 1990; Turk et al., 1991), что связано со структурой промотора *virA* (Turk et al., 1993). Из раневых экссудатов винограда было выделено другое фенольное соединение, метиловый эфир сиринговой кислоты, способное индуцировать экспрессию *vir*-генов УХС-штаммов, правда также в очень высоких, возможно, нефизиологических концентрациях (Spencer et al., 1990). Поскольку УХС-штаммы все-таки способны вызывать опухолеобразование у некоторых растений, их *vir*-гены каким-то образом индуцируются. Возможно, что либо в экссудатах хозяев УХС-штаммов содержится еще не идентифицированный индуктор, либо для появления опухолей на этих растениях достаточно и низкого уровня экспрессии *vir*-генов.

Помимо фенольных соединений, белок VirA с помощью периплазматического белка ChvE, кодируемого хромосомным геном (Cangelosi et al., 1990; Shimodo et al., 1990) воспринимает моносахариды. Сначала с сахарами соединяется ChvE, затем он взаимодействует с VirA, и в присутствии фенольных соединений они совместно индуцируют экспрессию *vir*-генов (глава 13). У мутантов по гену *virA*, потерявших способность к взаимодействию с ChvE, а, следовательно, и дополнительный эффект сахаров, круг хозяев сужается (Shimodo et al., 1993; Doty et al., 1996). Фенотип у таких мутантов такой же, как и у штаммов с мутацией в гене *chvE* (Doty et al., 1996; Huang et al., 1990). Дополнительные сведения о связи белка ChvE или комплекса ChvE-VirA с хозяйской специфичностью будут представлены в разделах III.A.2 и III.B.1 данной главы. Такие факторы внешней среды, как температура и pH, могут влиять на индукцию *vir*-генов агробактерий также через белок VirA (Turk et al., 1991; Jin et al., 1993a).

Важную роль белка VirA в определении хозяйской специфичности подтвердили эксперименты по агроинфекции однодольных, в особенности, кукурузы. «Агроинфекция» — это методика введения вирусных геномов в ядро растительной клетки в составе Т-ДНК *Agrobacterium*, точность которого фиксируется по развитию симптомов заболевания (Grimsley et al., 1986). Показано, что способность к агроинфекции у кукурузы, риса и пшеницы зависит от используемой Ti/Ri-плазмиды (Grimsley et al., 1987; Woolston et al., 1988; Boulton et al., 1989; Jarchow et al., 1991; Dasgupta et al., 1991). В этих исследованиях многие октопиновые штаммы *A. tumefaciens* характеризовались

неспособностью или слабой способностью к агроинфекции, тогда как агроинфекция штаммами нопаинового типа, так же как и *A. rhizogenes* агропинового и маннопинового типов, проходила с высокой эффективностью. Главное различие в способности к агроинфекции между штаммами заключалось в *virA*-кодируемом рецепторе растительных сигналов (Raineri et al., 1993). Предполагается, что белок VirA октопинового типа не индуцируется или его активность подавляется в присутствии экстрактов кукурузы. Это предположение подтверждается тем, что у мутантных по гену *virA* октопиновых штаммов, не зависящих от ацетосирингона и экспрессирующих *vir*-гены даже в отсутствие растительных сигналов (Ankenbauer et al., 1991), способность к агроинфекции очень высока (Raineri et al., 1993). Данный вывод находится в соответствии с тем, что эффективность агротрансформации кукурузы октопиновыми штаммами может быть значительно повышена при замене их собственного гена *virG* на *virGN54D*. В кодируемом этим геном белке VirG Asp в 54 положении замещается на Asp, в результате чего белок приобретает способность к конститутивной экспрессии *vir*-генов, не зависящей от VirA и растительных сигналов (Pazour et al., 1992; Jin et al., 1993b; Hansen et al., 1994).

II.A.2. Гены *virE* и *virC*

К изменению хозяйской специфичности приводят также мутации в локусах *virC* и *virE*. Они приводят к ослаблению или утрате вирулентности на одних видах растений, но, в то же время, сохраняется способность к нормальному заражению других растений (Klee et al., 1983; Hille et al., 1984; Nooykaas et al., 1984; Hirooka et al., 1987; Gardner, Knauf, 1986; Grimsley et al., 1989). Следует отметить, что, по-видимому, все мутации, приводящие к ослаблению вирулентности *Agrobacterium*, влияют на круг хозяев, поскольку разные растения обладают различной активностью образования корончатых галлов. Показано, что ген *virE2* в составе оперона *virE* кодирует белок, связывающийся с однонитевой ДНК (глава 15). Белок VirE2 выполняет множественные функции, способствуя перемещению и интеграции Т-ДНК внутри растительной клетки. На это указывает наличие сигналов ядерной локализации в составе этого белка, а также возможность заражения трансгенных растений, экспрессирующих *virE2*, агробактериальным мутантом по этому гену (Gardner, Knauf, 1986; Citovsky et al., 1992). Функцией белка VirC1, кодируемого опероном *virC*, является присоединение к энхансеру переноса Т-ДНК (*overdrive*), что способствует процессингу Т-ДНК и образованию Т-нити (Horsch et al., 1986; Toro et al., 1989a, 1989b; De Vos and Zambryski, 1989). Результаты изучения *virE* и *virC* свидетельствуют о том, что оба локуса участвуют в усилении инфекционности агробактерий. Возможно, что одним растениям для формирования опухолей необходим более эффективный перенос Т-ДНК, чем другим. Повышение этой эффективности при одном и том же исходном количестве бактерий может приводить к увеличению либо числа трансформированных клеток, либо числа встроившихся в каждую клетку копий Т-ДНК.

В дополнение к генам Т-ДНК, для восстановления фенотипа ШХС в УХС-штамм вместе с геном *virA* из Ti-плазмиды ШХС-штамма должен быть введен ген *virC* (Yanofsky et al., 1985a). Кроме того, локус *virC* ШХС-штаммов участвует в запуске некротической реакции у некоторых сортов *Vitis*, а мутанты по данному локусу теряют эту способность, по-видимому, вследствие снижения частоты трансформации (Yanofsky et al., 1985a; Deng et al., 1995b). Опыты по агроинфекции *Zea mays* и *Brassica* с использованием мутантов по генам *virC* и *virE* подтверждают предположение об их участии в контроле хозяйской специфичности (Grimsley et al., 1989). При использовании штаммов *A. tumefaciens*, несущих мутации в области вирулентности плазмиды pTiC58 нопаинового типа, эффективность агроинфекции кукурузы вирусом полосатости полностью зависела от продуктов оперона *virC*. В то же время, при агроинфекции *Brassica rapa* вирусом мозаики цветной капусты зависимость от гена *virC* была менее выражена. У *virE*-мутантов снижена эффективность агроинфекции обоих растений (Grimsley et al., 1989). На основании этих данных можно предположить, что *virC* выполняет функцию, более важную при трансформации однодольных, чем двудольных.

II.A.3. Ti-специфичные гены: *virF*, *pinF* (*virH*), *tzs* и *virJ*

vir-район является одним из наиболее консервативных на Ti-плазмиде. На всех изученных к настоящему времени плаزمиде взаимное расположение *vir*-генов одинаково (глава 13). Однако

можно обнаружить различия между штаммами и по этому высоко консервативному району. Например, особенностью октопиновых Ti-плазмид считается наличие трех оперонов, *virF*, *virH* и *virJ*, а плазмиды нопалинового типа содержат уникальный ген *tzs* (Binns, Thomashow, 1988; Hooykaas, Beijersbergen, 1994; Kalogeraki, Winans, 1995; Pan et al., 1995). Хотя перечисленные гены отличаются от *virA*, *virE* и *virC* тем, что являются Ti-специфичными, они также находятся под контролем двухкомпонентной системы VirA/VirG и индуцируются сигнальными молекулами растений, как и другие *vir*-гены. Поскольку их роль в опухолеобразовании несущественна, они, вероятнее всего, участвуют в определении круга хозяев агробактерий.

***virF*.** Штаммы *A. tumefaciens* с нопалиновыми Ti-плазмидами, в отличие от штаммов с октопиновыми или лейцинопиновыми плазмидами, характеризуются слабой вирулентностью при инокуляции *Nicotiana glauca* (Melchers et al., 1990). Причиной различий в вирулентности между нопалиновыми и октопиновыми штаммами является ген *virF*, который присутствует в *vir*-области только октопиновых плазмид (Melchers et al., 1990). Он необходим для образования опухолей на *N. glauca*, поскольку *virF*-мутанты октопиновых штаммов обладают сниженной вирулентностью на данном растении (Otten et al., 1984; Melchers et al., 1990).

Ген *virF* интересен тем, что при его мутациях вирулентность может быть восстановлена при совместной инфекции со штаммом-помощником, несущим интактную *vir*-область, но не содержащим Т-ДНК (Otten et al., 1984; Melchers et al., 1990). В помощнике, помимо *virF*, должны обязательно экспрессироваться опероны *virA*, *virB*, *virD* и *virG* (Melchers et al., 1990). Интересно, что аналогичные результаты были получены для *virE*-мутантов (Otten et al., 1984; Christie et al., 1988). Так же как и в случае с *virE* (Citovsky et al., 1992), трансгенные растения *N. glauca*, экспрессирующие ген *virF*, восстанавливают вирулентность *virF*-мутантов октопиновых штаммов и становятся хозяевами для нопалиновых штаммов (Regensburg-Tuink, Hooykaas, 1993). Это показывает, что белок VirF функционирует в пределах растительной клетки. Вероятнее всего, оба белка, VirE и VirF, попадают в растительную клетку через тот же канал, что и Т-ДНК. Было бы интересно обнаружить в этих белках одинаковые сигналы, распознаваемые транспортным комплексом. Показано, что при агроинфекции кукурузы октопиновыми штаммами в присутствии *virF* запускается механизм, приводящий к частичному ингибированию транспорта Т-ДНК (Jarchow et al., 1991). И хотя функции белка VirF до сих пор неизвестны, имеющиеся данные указывают на то, что он участвует в переносе Т-ДНК внутри клетки растения-хозяина.

***virH* (*pinF*).** Мутанты октопиновых штаммов по локусу *virH* характеризуются ослабленной вирулентностью при заражении ряда двудольных растений, причем ослабление становится более выраженным при снижении количества бактерий в инокуляте (Kanemoto et al., 1989). Оба кодируемых локусом *virH* полипептида похожи друг на друга и на группу ферментов цитохрома P450, катализирующих NADH-зависимое окисление ряда субстратов (Kanemoto et al., 1989). Поскольку для индукции опухолеобразования требуется очень большое количество *virH*-негативных бактерий, предполагается, что при мутациях по этому локусу снижается эффективность трансформации растительных клеток. Возможно, белки VirH участвуют в нейтрализации токсичных веществ, присутствующих в растительной раневой жидкости и, таким образом, способствуют росту бактерий *in planta*. Существовало предположение о том, что оперон *virH* специфичен исключительно для октопиновых Ti-плазмид, поскольку в нопалиновых плазмидах место, соответствующее этому оперону, занимает ген *tzs* (Jarchow et al., 1991; Hooykaas, Beijersbergen, 1994). Однако с помощью *virH*-специфичной пробы нам удалось обнаружить гомологичные *virH* последовательности в нопалиновых, а также в сукцинамопиновых Ti-плазмидах (Hood et al., 1986; Kovacs, Rueppke, 1994) и в штаммах *A. rhizogenes*, хотя у *A. vitis* гомологов не найдено. Это позволяет предполагать, что некоторые *vir*-гены, считающиеся специфичными для определенных Ti-плазмид, могут на самом деле присутствовать и в составе других типов плазмид, находясь в другом положении. Широкое распространение гена *virH* среди разных типов Ti/Ri-плазмид свидетельствует о важности выполняемых им функций для инфекционного процесса.

***tzs*.** Ген *tzs* кодирует цитокинин-пренил-трансферазу, участвующую в синтезе транс-зеатина (Akiyoshi et al., 1985, 1987; Beaty et al., 1986). Его экспрессия индуцируется растительными сигналами через систему белков VirA/VirG (John, Amasino, 1988; Powell et al., 1988). Ген *tzs* обнаружен в составе *vir*-районов нопалиновых Ti-плазмид, а также агропиновых и маннопиновых Ri-плазмид, но не в октопиновых или сукцинамопиновых Ti-плазмидах (Beaty et al., 1986; Akiyoshi et al., 1987). Его функция пока неизвестна, однако необходимость цитокинина для агротрансформации и отсутствие *tzs* в составе некоторых плазмид наводят на мысль о том, что *tzs* участвует в определении круга хозяев. Показано, что мощность корнеобразования на эксплантах семян льна при инокуляции агропиновым штаммом *A. rhizogenes* увеличивается при совместной инокуляции с "обезоруженным" штаммом *A. tumefaciens*, содержащим плазмиду с геном *tzs* (Zhan et al., 1990). Эти результаты показывают, что несущественный для самого процесса трансформации ген *tzs* может способствовать ее протеканию, возможно, за счет стимуляции клеточных делений в сайте поранения и подготовки растительных клеток к эффективной трансформации. Для выяснения того, выполняет ли ген *tzs* аналогичные функции у *A. rhizogenes*, необходимы дальнейшие исследования.

***virJ*.** Ген *virJ* расположен на плазмиде между оперонами *virA* и *virB*, его экспрессия регулируется растительными сигналами под контролем системы VirA/VirG. Наличие этого гена специфично для октопиновых Ti-плазмид, в нопалиновых плазмидах он отсутствует (Kalogeraki, Winans, 1995; Pan et al., 1995). Это единственный *vir*-ген, мутации в котором не влияют на вирулентность агробактерий (Stachel, Nester, 1986; Melchers et al., 1987). Хотя не получено данных, указывающих на роль гена *virJ* в детерминации хозяйской специфичности, интерес к этому гену обусловлен тем, что его продукт выполняет те же функции, что и кодируемый хромосомным геном белок AcvB (Wirawan et al., 1993; Kalogeraki, Winans, 1995; Pan et al., 1995). Ген *acvB* присутствует как в октопиновых, так и в нопалиновых штаммах, что и объясняет отсутствие влияния мутаций в гене *virJ* на вирулентность октопиновых штаммов. Мутантные по гену *acvB* нопалиновые штаммы являются авирулентными (Wirawan et al., 1993), а введение *virJ* восстанавливает это свойство (Kalogeraki, Winans, 1995; Pan et al., 1995), что указывает на важность функций, выполняемых AcvB/VirJ. Этот факт также говорит о взаимозаменяемости *virJ* и *acvB* в отношении функций, выполняемых в ходе опухолеобразования. В отличие от *virJ*, *acvB* не контролируется системой VirA/VirG и растительными сигналами. В составе белка VirJ обнаружен сигнальный пептид, указывающий на локализацию в периплазматическом пространстве (Pan et al., 1995). Сообщалось о наличии у белка AcvB способности к связыванию с одонитевой ДНК (Kang et al., 1994), однако в дальнейшем эти сведения не подтвердились. Показано, что штамм, лишенный обоих генов, не способен к переносу Т-ДНК в растительные клетки, хотя Т-нити образуются нормально. Таким образом, присутствие белка VirJ или AcvB необходимо для переноса Т-ДНК в растение (Kang et al., 1994; Pan et al., 1995). Правдоподобным выглядит предположение о том, что присутствие *virJ* у октопиновых штаммов позволяет трансформировать дополнительные виды растений, которым необходим более эффективный перенос Т-ДНК для опухолеобразования. В процессе инфекции белок VirJ может дополнять функции AcvB, если его количество недостаточно для индукции этого процесса.

Весьма интересным фактом является несущественность ряда *vir*-генов, например *virF*, *virH*, *tzs*, *virJ*, *virD3* и *virD5*, для нормального протекания трансформации (Нооукаас, Beijersbergen, 1994). Хотя эти гены входят в состав многих Ti-плазмид и контролируются теми же регуляторными механизмами, что и остальные *vir*-гены, мутации в них либо совсем не влияют на вирулентность, либо лишь незначительно ослабляют ее при заражении некоторых растений-хозяев. Возможно, что, по крайней мере, некоторые из этих генов представлены двумя копиями, хромосомной и плазмидной, и поэтому кажутся ненужными, как это обнаружено для *virJ*. Этот ген мог возникнуть в результате дупликации хромосомного гена *acvB*, а затем одна из копий перешла в состав плазмиды и превратилась в *virJ*. Наличие вокруг *virJ* последовательностей, сходных с инсерционными элементами, позволяет предполагать, что перемещение копии гена *acvB* из хромосомы в плазмиду произошло при транспозиции мобильного элемента (Нооукаас, Beijersbergen, 1994; Pan et al., 1995). Белок VirJ гомологичен не всему белку AcvB, а только его С-терминальному концу.

Возможно, что в процессе эволюции N-терминальный домен AcvB был замещен регуляторной последовательностью, характерной для остальных *vir*-генов (Pan et al., 1995). Новый белок, VirJ, мог оказаться более приспособленным для выполнения своей функции в ходе опухолеобразования и поэтому сохранился. Сходные события произошли, скорее всего, и в случае с *virH*, поскольку у *Agrobacterium* должны существовать P450-зависимые ферменты, кодируемые хромосомными генами, и поскольку остатки инсерционных элементов также были обнаружены перед геном *virH* (Kanamoto et al., 1989; Deng et al., 1995a). Имеющиеся данные позволяют предполагать, что мобильные элементы играли большую роль в эволюции Ti-плазмид (Otten et al., 1992; Deng et al., 1995a). Генные дубликации обнаружены также у *Rhizobium* spp. и других бактерий (Kalogeraki, Winans, 1995). У одноклеточных организмов горизонтальный перенос генов происходит достаточно регулярно. У эукариот показана возможность переноса генов органелл (хлоропластов и митохондрий) в ядерный геном (Nygent, Palmer, 1991).

Поскольку для опухолеобразования различным растениям может быть необходима разная эффективность трансформации, участие «ненужных» *vir*-генов в контроле хозяйской специфичности можно проверить только путем тестирования широкого круга растений. Изучение таких генов проводилось исключительно в лабораторных условиях. В природе их наличие может быть необходимым для успешной трансформации, поскольку окружающие условия более суровы, а популяции бактерий, индуцирующих инфекционный процесс, малочисленны. Вовлечение в опыты новых штаммов агробактерий, возможно, позволит выявить более тонкие различия в организации *vir*-районов разных типов Ti-плазмид. Вероятно, что в ходе эволюции *Agrobacterium* характеристики *vir*-районов (Т-ДНК) менялись при адаптации к конкретным растениям-хозяевам или условиям среды.

II.B. Т-ДНК И ХОЗЯЙСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

II.B.1. Гены, входящие в состав Т-ДНК

У агробактериальных штаммов дикого типа, для которых растение-хозяин оценивается по способности вызывать формирование опухолей или бородачатых корней, а процессы переноса и интеграции Т-ДНК сами по себе не имеют адаптивного значения, важность генов, входящих в состав Т-ДНК, в определении круга хозяев не вызывает сомнения. Экспрессия генов Т-ДНК, в результате которой происходит сверхсинтез и/или увеличивается чувствительность к растительным гормонам, является основной причиной неопластического роста. Как и в случае *Rhizobium*, где тип продуцируемого Nod-фактора определяет вступление в симбиоз с конкретным бобовым растением, от набора генов в составе Т-ДНК будет зависеть, сможет ли штамм *Agrobacterium* вызвать опухоль- или корнеобразование. Вероятно, что у некоторых штаммов агробактерий круг хозяев сформировался в результате мутаций и/или перестроек в Т-ДНК, приводивших к оптимизации условий роста бактерий на конкретных растениях. В зависимости от выполняемых функций гены, входящие в состав Т-ДНК, могут быть разделены на три группы, контролирующие: 1) биосинтез фитогормонов (ауксины/цитокнины); 2) изменение чувствительности к гормонам; 3) синтез и секрецию опинов. В определение круга растений-хозяев вовлечены первые две группы генов.

Гены *tms* (*iaaM* и *iaaH*) и *tmr* (*ipt*) отвечают за биосинтез двух основных регуляторов, ауксинов и цитокининов. Эти гены входят в состав Т-ДНК наиболее вирулентных штаммов агробактерий, и, как правило, эти штаммы обладают широким кругом растений-хозяев. Некоторые штаммы *A. vitis* характеризуются слабым или дефектным геном *tmr* и, одновременно, узким кругом хозяев. Введение гена *tmr* из ШХС-штамма в Т-ДНК УХС-штаммов (*A. vitis* Ag63 и Ag162) расширяет круг хозяев последних (Buchholz, Thomashow, 1984; Hoekema et al., 1984; Yanofsky et al., 1985a, 1985b), однако до известного предела. Как минимум еще два гена, *virA* и *virC*, из *vir*-области ШХС-штамма должны быть введены в Ti-плазмиду УХС-штамма, чтобы расширить хозяйскую специфичность (Yanofsky et al., 1985a; раздел II.A. данной главы).

Другим примером роли генов Т-ДНК в определении хозяйской специфичности является биотип 2, УХС-штамм *A. tumefaciens* AB2/73. Этот штамм способен индуцировать опухоли на *Lippia canescens* и некоторых других растениях (Unger et al., 1985). По-видимому, узость круга его хозяев

связана с отсутствием нормально функционирующих генов биосинтеза ауксина, поскольку введение в его Т-ДНК генов *tms* из ШХС-штамма увеличивает число инфицированных растений.

Гены *tms* (или *iaa*) важны и для определения круга хозяев *A. rhizogenes* (White et al., 1985). Это показывает, что разные виды растений чувствительны к различным уровням и соотношениям ауксинов и цитокининов. Некоторые гены Т-ДНК, а именно гены *5* и *6b* Ti-плазмиды и *rol*-гены Ri-плазмиды, изменяют чувствительность растительных тканей к гормонам, и таким образом регулируют работу генов *tms* и *tmr* (глава 12). Эти гены являются хорошими кандидатами на участие в контроле ХС, но пока подобной функции у них не выявлено. Исключение составляет ген *6b*, присутствия которого достаточно для образования мелких опухолей на растениях *Nicotiana glauca* и *Kalanchoe tubiflora*, что позволяет говорить об участии гена *6b* в определении круга растений-хозяев (Hooykaas et al., 1988).

Круг хозяев агробактерий отражает состав их Т-ДНК. Так, количество функциональных генов в Т-ДНК сильно варьирует у *A. vitis*, в основном из-за мутаций и делеций, вызываемых транспозонами, и перестроек, вызываемых инсерционными элементами (Otten et al., 1992). Хотя все эти штаммы взаимодействуют преимущественно с виноградом, некоторые из них при искусственном заражении могут вызывать опухолообразование и на других видах растений и относятся, таким образом, к ШХС-штаммам (Anderson, Moore, 1979; Loper, Kado, 1979; Thomashow et al., 1980; Knauf et al., 1982). Некоторые из УХС-изолятов характеризуются наличием дефектов Т-ДНК (Buchholz, Thomashow, 1984; Hoekema et al., 1984; Yanofsky et al., 1985a). Эти штаммы являются прекрасной моделью для изучения роли генов Т-ДНК в определении ХС.

II.B.2. Границы Т-ДНК

Границы Т-ДНК определяют длину и состав генов переносимого в растение участка ДНК. Обнаружено, что в процессе эволюции штамма с узким кругом хозяев Ag57 *A. vitis* произошла делеция правой границы его Т_А-ДНК (Paulus et al., 1991). Этот штамм сохранил способность к индукции опухолей у *Nicotiana rustica* и *Vitis vinifera*, предположительно, за счет псевдограницной последовательности, но оказался неспособным инфицировать *Nicotiana tabacum*. Однако эту способность можно восстановить, если ввести в Ti-плазмиду последовательность правой границы Т_А-ДНК, что указывает на важную роль правой границы в образовании опухолей на некоторых, но не всех, растениях. Этот факт показывает, что одни растения более чувствительны к низкоэффективному переносу Т-ДНК, чем другие.

Энхансер процессинга Т-ДНК (*overdrive*) также может участвовать в определении ХС (Peralta, Ream, 1985; Peralta et al., 1986; Cullanez-Macia, Hepburn, 1988). Его эффект, вероятнее всего, опосредован геном *virC*, поскольку показано, что белок VirC присоединяется к этой последовательности, предположительно запуская процессинг Т-ДНК (Toro et al., 1989b; раздел II.A.2. данной главы). Доказательство того, что последовательность *overdrive* необходима для опухолообразования, будет также свидетельствовать о чувствительности растений к эффективности переноса Т-ДНК.

II.B.3. Некротическая реакция

Некоторые штаммы *A. vitis* обладают неполным набором генов, входящих в состав Т-ДНК, и не индуцируются наиболее характерными фенольными индукторами растений (разделы II.A.1. и II.B.1. данной главы). Однако эти штаммы эффективно вызывают опухолообразование у многих генотипов винограда, что указывает на их высокую чувствительность к трансформации. В этой связи удивительно, что многие вирулентные ШХС-штаммы *A. tumefaciens* не могут индуцировать опухоли на винограде, а вместо этого вызывают некротическую реакцию (гибель растительных клеток) в месте инфекции (Yanofsky et al., 1985a). Для этого необходимы как *vir*-район, так и Т-ДНК, но ответственность за индукцию некротической реакции лежит непосредственно на Т-ДНК (Yanofsky et al., 1985a; Pu, Goodman, 1992). Мутации в локусе *virC* препятствуют появлению некрозов и приводят к появлению опухолей, что указывает на важность высокоэффективного переноса Т-ДНК. Анализ некрозообразования у винограда, вызываемого супервирулентным штаммом *A. tumefaciens* A281 (Hood et al., 1986; Jin et al., 1987), показал, что за индукцию некрозов отвечают

2 гена Т-ДНК, *tms1* и *bb* (Deng et al., 1995b). Поскольку эти гены вовлечены в контроль синтеза и чувствительности к ауксину, логично предположить, что развитие некрозов при инокуляции агробактериями связано с токсичностью ауксина (Deng et al., 1995b). В соответствии с этой гипотезой находятся данные о влиянии полярности стебля на развитие некрозов у винограда и о необычной структуре Т-ДНК штамма A281. Эти данные позволяют предположить, что высокая эффективность переноса Т-ДНК и наличие полного набора генов в составе Т-ДНК не всегда обеспечивают успешную индукцию образования опухолей на растении. Адаптация штамма к конкретному хозяину является следствием тонкой настройки генов *vir*-района и Т-ДНК, происходившей при взаимодействии бактерии и растения в ходе эволюции. Возможно, что события, сходные с некротической реакцией, могут объяснить кажущуюся устойчивость некоторых растений, помимо видов *Vitis*, к опухолеобразованию.

III. Хромосомные детерминанты хозяйской специфичности

III.A. ГЕНЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ХОЗЯЙСКУЮ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Хотя Ti-плазида является основным детерминантом ХС, хромосомный фон также играет важную роль в определении круга хозяев *Agrobacterium*. Действительно, одни и те же Ti-плазмиды могут определять разную ХС в зависимости от хромосомного фона бактерий (Hamada, Farrand, 1980; Knauf et al., 1982). Помимо *vir*-генов Ti-плазмиды, для опухолеобразования необходимы также некоторые хромосомные гены (Hooykaas, Beijersbergen, 1994), которые можно разделить на две группы в зависимости от функций, предположительно выполняемых в процессе индукции опухолей. Первая группа кодирует белки, взаимодействующие с растением. В их функции входит прикрепление к поверхности клетки, а также выживание и рост в ранке растения. Другая группа вовлечена в индукцию *vir*-генов или переноса Т-ДНК, что, по-видимому, оптимизирует работу Ti-плазмиды для эффективной индукции опухолей. Для некоторых из этих хромосомных генов четко показано участие в контроле ХС. Хотя эти гены идентифицировали благодаря их участию в контроле вирулентности агробактерий, многие из них выполняют двойную функцию, контролируя физиологические свойства бактерий, не относящиеся к процессу трансформации, что отражается в плеiotропном эффекте мутаций. Поэтому выявление дополнительных хромосомных генов, участвующих в контроле вирулентности агробактерий и вовлеченных во взаимодействие с растительными клетками, возможно только в случае получения по этим генам мутантов, не являющихся нуль-мутантами.

III.A.1. Гены, контролирующие взаимодействие с растением

Одним из самых ранних этапов в индукции опухолеобразования является сайт-специфическое прикрепление бактерии к клетке растения (Lippincot, Lippincot, 1969). Впервые важная роль хромосомы агробактерий в опухолеобразовании была показана именно для генов, вовлеченных в прикрепление бактерии (см. также гл.11). Таким генами являются *chvA* и *chvB* (Douglas et al., 1982, 1985), *exoC* (*pscA*) (Cangelosi et al., 1987; Thomashow et al., 1987) и *att* (Matthysse, 1987). Мутации по ним приводят к авирулентности или сильным нарушениям вирулентности при заражении многих видов растений. По-видимому, целлюлозные фибриллы, расположенные на поверхности клеток *A. tumefaciens*, также способствуют плотному прикреплению к хозяйской клетке, поскольку *cel*-минус мутанты характеризуются пониженной вирулентностью (Matthysse, 1983; Minnemeyer et al., 1991).

Среди всех перечисленных генов, по-видимому, только локусы *att* являются специфичными для прикрепления, однако функции продуктов этих генов еще не выяснены. Продукты генов *chvB* и *chvA* участвуют в синтезе и экспорте циклического β -1,2-глюкана, соответственно (Puwanesarajah et al., 1985; Zorreguieta et al., 1988), а функция гена *exoC* существенна для продукции внеклеточных полисахаридов (Cangelosi et al., 1987; Uttaro et al., 1990). Каким образом гены *chvA/chvB* и *exoC* контролируют непосредственно прикрепление, еще до конца не выяснено, но, скорее всего, это сопряжено с формированием структуры клеточной поверхности. Мутации по гену *chvB* характеризуются плеiotропным проявлением, у них, в частности, нарушено прикрепление к раститель-

ной клетке, они неподвижны и авирулентны (Douglas et al., 1982; Swart et al., 1994a). Показано, что функции прикрепления и вирулентность *chvB*-мутантов можно восстановить при их выращивании на среде с высоким содержанием кальция и высоким осмотическим давлением (Swart et al., 1994b). Восстановление вирулентности в этом случае частично связано с синтезом рикадгезина, бактериального Ca^{2+} -связывающего белка, осуществляющего первый этап прикрепления бактерий к растительной клетке. К сожалению, мутанты агробактерий, не способные к синтезу рикадгезина, изолированы не были, что затрудняет выяснение точной функции этого белка. Предполагается, что циклический β -1,2-глюкан не участвует непосредственно в прикреплении и не связан с вирулентностью, однако косвенно влияет на эти признаки через осморегуляторный эффект (O'Connell, Handelsman, 1989; Swart et al., 1994b). Предположение об участии *chvB* в контроле ХС основано на том, что мутанты по этому гену, авирулентные на большинстве растений, все же сохраняют способность к индукции опухолей на некоторых растениях, например на *Solanum tuberosum* (Нооукаас, Шилпергоорт, 1986). Растительные рецепторы, к которым прикрепляется *Agrobacterium*, изучались только в одной лаборатории. Показано, что антитела к витронектину и анти-витронектину человека ингибировали присоединение *A. tumefaciens* к клеткам моркови, что свидетельствует о возможной роли витронектин-подобных молекул в качестве рецепторов для прикрепления агробактерий к растительной клетке (Wagner, Matthysse, 1992). Интересно, что мутанты по генам *chvB*, *exoC* и *att* характеризуются пониженным связыванием витронектина. Таким образом, гены, контролирующие прикрепление к растительной клетке, являются весьма вероятными кандидатами на роль детерминантов ХС. И хотя проведенные исследования не выявили прямого участия продуктов генов *chvA/B*, *exoC* и *att* в детерминации хозяйской специфичности, они показали важность процесса прикрепления бактерий для вирулентности. Поскольку прикрепление абсолютно необходимо для трансформации, неудивительно, что ноль-мутанты по этим генам авирулентны практически на всех растениях. Их роль в контроле хозяйской специфичности может быть прояснена, если будут получены более слабые (точковые) мутанты по этим генам.

У *Agrobacterium* выявлены хромосомные гены, влияющие на рост и выживание в ранке растения. У мутантов по двухкомпонентной сенсорной системе ChvG/ChvI, контролируемой хромосомными генами, наблюдали ингибирование роста раневыми экссудатами растения и повышение чувствительности к кислой среде (Charles, Nester, 1993; Mantis, Winans, 1993). Эти гены вовлечены также в индукцию *vir*-области. Мутанты по генам *chvG/I* авирулентны или слабо вирулентны при заражении ряда видов растений. И хотя не ясно, вовлечены ли эти два гена в детерминацию ХС, обнаружение регулируемых ими генов и внешних сигналов, узнаваемых ChvG/ChvI-зависимой сенсорной системой, скорее всего, будет способствовать выявлению новых детерминантов хозяйской специфичности. Однако, интерпретация данных, полученных при изучении этих генов, затруднена их плейотропным действием.

III.A.2. Гены, влияющие на экспрессию *vir*-генов или перенос Т-ДНК

Выявлен ряд хромосомных генов, влияющих на экспрессию *vir*-генов агробактерий. Как было отмечено ранее, уровень экспрессии *vir*-генов и эффективность процессинга и переноса Т-ДНК играют важную роль в хозяйской специфичности агробактерий, что указывает на вероятное участие этих генов в определении круга хозяев.

***chvE*.** Ген *chvE* является, вероятно, наиболее хорошо изученным из всех *chv*-генов. Его роль в индукции *vir*-генов и в определении ХС четко показана. Ген *chvE* кодирует периплазматический галактозо-связывающий белок (Cangelosi et al., 1990; Huang et al., 1990), который обеспечивает хемотаксис к ряду сахаров и синергический эффект сахаров при опосредованной белком VirA активации *vir*-генов ацетосирингоном (Cangelosi et al., 1990; Shimodo et al., 1990). Доказательство участия гена *chvE* в контроле ХС основано на том, что мутации в этом гене приводят к авирулентности только на некоторых видах растений (Huang et al., 1990). В дополнение к этому, штаммы с мутантным белком VirA, нечувствительным к сахарам, и, по-видимому, не взаимодействующим с ChvE, характеризуются тем же кругом растений-хозяев, что и *chvE*-мутанты (Doty et al., 1996). Ген *chvE* представляет собой пример хромосомного гена *Agrobacterium*, участвующего как в контроле физиологии бактериальной клетки, так и в передаче сигнала, необходимого для трансформации растения.

cbg. Некоторые штаммы *A. tumefaciens*, инфицирующие голосеменные растения, несут на хромосоме специальные гены, продукты которых могут конвертировать кониферин, не являющийся в норме индуктором *vir*-генов, в конифериловый спирт — потенциальный индуктор (Morris, Morris, 1990; Castle et al., 1992). Показано, что штаммы, имеющие высокую β -глюкозидазную активность, реагируют на кониферин и способны инфицировать проростки ели Дугласа, тогда как штаммы с низкой β -глюкозидазной активностью нечувствительны к кониферину и, в результате, авирулентны на этом растении (Castle et al., 1992). Два гена β -глюкозидазы (*cbg*) клонированы и перенесены в *E. coli*, вследствие чего ее клетки приобретали способность к гидролизу кониферина (Castle et al., 1992). Но поскольку агробактериальные мутанты по этим генам не были получены, трудно говорить об их роли в придании агробактериям способности трансформировать ель Дугласа.

miaA и ros. Ген *miaA* кодирует тРНК-изоментилтрансферазу. Мутации по нему снижают в 2-10 раз экспрессию *vir*-генов под действием ацетосирингона (Gray et al., 1992). Вероятной причиной этого является пониженная эффективность трансляции. Возможно, что этот эффект не специфичен именно для *vir*-генов, поскольку мутанты по *miaA* вирулентны для большинства хозяев, однако некоторое снижение вирулентности обнаружено на картофеле, что указывает на роль гена *miaA* как детерминанта ХС (Gray et al., 1992). Другой хромосомный ген, *ros*, кодирует репрессор оперонов *virC* и *virD* (Cooley et al., 1991; D'Souza-Ault et al., 1993). Мутации в этом гене вызывают конститутивную экспрессию генов *virC* и *virD* и некоторые другие изменения фенотипа бактерий (Close et al., 1987). Поскольку оперон *virC* участвует в процессинге Т-ДНК и детерминации ХС, а *virD* важен для процессинга и переноса Т-ДНК, ген *ros* может контролировать количество белков VirC и VirD, необходимое для эффективной инфекции конкретного хозяина. Однако до сих пор влияния гена *ros* на ХС обнаружено не было.

ivr, chvG/chvI, chvD и acvB. Некоторые из этих генов совершенно необходимы для обеспечения вирулентности, тогда как другие, скорее всего, являются детерминантами ХС с неустановленным пока механизмом действия. Выявлены 3 хромосомных локуса (*ivr*), необходимые для индукции *vir*-генов и обеспечения вирулентности (Metts et al., 1991). Мутанты по двум из них авирулентны на всех протестированных растениях, а мутанты по третьему гену сохраняли вирулентность на одних растениях и были авирулентными на других. Сужение круга хозяев у этих мутантов, возможно, происходит за счет снижения в них уровня экспрессии *vir*-генов, однако это пока не доказано из-за плеiotропного эффекта мутаций по генам *ivr*.

Гены *chvG/I* вовлечены не только в контроль выживания и роста бактерий в ранке растения, но также участвуют и в экспрессии *vir*-генов: мутанты по *chvG/I* не способны индуцировать экспрессию собственных *vir*-генов (Charles, Nester, 1993; Mantis, Winans, 1993). Однако неясно, каким образом они влияют на ХС, а плеiotропное проявление мутаций по этим генам еще более усложняет ситуацию. Возможно, некоторые из генов, регулируемых *chvG/chvI*, в ответ на определенные стимулы внешней среды могут менять ХС агробактерий.

Ген *chvD* кодирует периплазматическую АТФ-азу (Winans et al., 1988). Его мутации влияют на индукцию гена *virG* при низких значениях рН и голодании по фосфору. Этот ген, возможно, участвует в контроле ХС, поскольку мутанты по нему обладают пониженной вирулентностью при заражении некоторых видов растений (Winans et al., 1988).

Ген *acvB* выполняет функцию, существенную для переноса Т-ДНК у нопалиновых штаммов, а в октопиновых штаммах такую же функцию выполняет ген *virJ* (Wirawan et al., 1993; Kalogeraki, Winans, 1995; Pan et al., 1995). Возможно, ген *acvB* может влиять на ХС октопиновых штаммов в том случае, когда присутствие белков VirJ и AcvB является лимитирующим фактором.

III.B. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ ГЕНАМИ ХРОМОСОМЫ И Т1-ПЛАЗМИДЫ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ХОЗЯЙСКОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ

Как видно из данных, приведенных выше, ни хромосома, ни Т1-плазмида агробактерий не содержат всей генетической информации, необходимой для переноса Т-ДНК и индукции опухолей. Хромосомный фон может модифицировать или приспособлять к соответствующим условиям функции вирулентности, контролируемые Т1-плазмидой. На основе многих данных можно го-

ворить о важности взаимодействия между хромосомой и Ti-плазмидой в обеспечении инфекционности *Agrobacterium* (Hood et al., 1986, 1987; Paulus et al., 1989a, 1989b; Kovacs, Rueppke, 1993). Об этом говорит и возможность конъюгативного переноса Ti-плазмид между бактериями (глава 10), причем в некоторых случаях трансконъюганты, обладающие одной и той же Ti-плазмидой, но разным хромосомным фоном, различались по ХС и вирулентности. Важность взаимодействия хромосомы и Ti-плазмиды можно показать на примерах феномена «супервирулентности» и тесной ассоциации определенных Ti-плазмид и хромосом у патогенных для винограда штаммов.

III.B.1. Феномен «супервирулентности»

Штамм A281 *A. tumefaciens* является гибридом, содержащим Ti-плазмиду из сукцинамопинового штамма Bo542 и хромосому нопалинового штамма C58 (Sciaky et al., 1978). По сравнению с родительскими штаммами, A281 индуцирует у многих растений более крупные и рано появляющиеся опухоли. Этот штамм способен вызывать опухолеобразование у сои и люцерны, не входящих в круг растений-хозяев донора Ti-плазмиды Bo542 (Hood et al., 1986, 1987; Kovacs, Rueppke, 1993). Было высказано предположение о том, что супервирулентность этого штамма связана с генами *virB* и *virG* плазмиды pTiBo542 (Hood et al., 1986; Jin et al., 1987). И действительно, несупервирулентные штаммы, несущие эти гены, могут трансформировать некоторые устойчивые растения (Komari, 1990; Hiei et al., 1994; Ishida et al., 1996). Однако нельзя недооценивать вклад хромосомы и взаимодействия между хромосомой и Ti-плазмидой, поскольку штамм, несущий ту же Ti-плазмиду, но на естественном хромосомном фоне (Bo542), вирулентен не в такой степени, как A281 (Hood et al., 1987). Это указывает на роль хромосомы в реализации опухолеобразующей способности, кодируемой Ti-плазмидой.

Влияние хромосомы на возможности Ti-плазмиды было обнаружено и при изучении природного штамма *A. tumefaciens* Chry5, неотличимого по вирулентности от A281 (Kovacs, Rueppke, 1993). Показано, что хромосома Chry5 усиливает вирулентность трех Ti-плазмид (pTiAch5, pTiT37, pTiBo542) при заражении сои по сравнению с исходными для них штаммами, хотя pTiBo542 и pTiChry5 характеризовались наибольшей опухолеиндуцирующей способностью (Kovacs, Rueppke, 1993, 1994). Плазмиды pTiBo542 и pTiChry5 очень сходны и контролируют синтез маркерного опина, L,L-сукцинамопина (Kovacs, Rueppke, 1994). Интересно, что родительские штаммы Bo542 и Chry5 были исходно выделены из таксономически родственных растений-хозяев (Miller, 1975; Sciaky et al., 1978). Эти данные показывают, что влияние хромосомы опосредует как позитивно, так и негативно действующие факторы.

Обнаружено влияние хромосомного гена *chvE* на способность к индукции *vir*-генов различных Ti-плазмид ацетосирингоном. Гибридный штамм A348, обладающий Ti-плазмидой октопинового штамма A6 и хромосомой нопалинового штамма C58, можно индуцировать низким уровнем ацетосирингона в присутствии сахаров, синергично активирующих *vir*-гены посредством ChvE (Cangelosi et al., 1990; Shimodo et al., 1990). Присутствие сахаров необязательно для индукции A348, если уровень ацетосирингона достаточно высок. Показано, что даже у штамма C58 при наличии высокого уровня ацетосирингона белку VirA необходимо взаимодействие с ChvE для индукции *vir*-генов, тогда как мутации в гене *chvE* штамма A348 при тех же условиях не оказывали влияния на способность к индукции (Doty et al., 1996). Это показывает, что взаимодействие между белком ChvE, кодируемым хромосомой штамма C58, с белком VirA плазмиды pTiC58, отличается от взаимодействия с белком VirA, кодируемым pTiA6. У другого трансконъюганта, CB100, полученного на основе штамма C58, но содержащего плазмиду из штамма D10B/87 биотипа II *A. tumefaciens*, обнаружены дефекты в индукции *vir*-генов, тогда как у родительского штамма D10B/87 этот признак нарушен не был. Неспособность к индукции *vir*-генов у D10B/87 связана, по крайней мере, частично с несовместимым взаимодействием кодируемого Ti-плазмидой белка VirA с контролируемым хромосомой штамма C58 белком ChvE (Belanger, Loubens, Nester, Dion, неопубликовано). Результаты этих исследований показывают, что способность к индукции *vir*-генов и другие параметры вирулентности агробактерий являются результатом коэволюции хромосомы и Ti-плазмиды и оптимизации отношений между ними.

Важное значение хромосомного фона для вирулентности вытекает также из следующего факта: Ti-плазмиды нопаинового типа, не имеющие гена *virJ*, могут поддерживать вирулентность на хромосомном фоне с функциональным геном *acvB*, выполняющим те же функции, что и *virJ* (Wirawan et al., 1993; Kalogeraki, Winans, 1995; Pan et al., 1995). Все эти данные позволяют надеяться на то, что можно обнаружить комбинации хромосома – Ti-плазмиды, придающие повышенную вирулентность хозяйскому штамму *A. tumefaciens*. Создание таких комбинаций имеет огромную практическую ценность, в особенности, для генетической инженерии устойчивых растений.

III.B.2. Штаммы, специфичные для винограда

Все штаммы *Agrobacterium* можно разделить на три группы в соответствии с их хромосомными маркерами (Kerr, 1992). Штаммы биотипа III, называемые теперь *A. vitis*, в природе ассоциированы исключительно с виноградом, хотя для некоторых из них показана индукция опухолей на других видах растений при искусственной инокуляции (Panagopoulos et al., 1978; Perry, Kado, 1982; Knauf et al., 1982; Burg et al., 1987). Хотя полноценное объяснение столь строгой хозяйской специфичности до сих пор отсутствует, выявлены факторы, хотя бы частично ответственные за специфичность взаимодействия *A. vitis* с виноградом. Одним из таких факторов является специфичный для *A. vitis* ген полигалактуроназы. В дополнение к корончатым галлам *A. vitis* вызывает корневую гниль, причем только на винограде (Burg et al., 1988), что и определяется полигалактуроназой (Rodriguez-Palenzuela et al., 1991). Этот фермент играет важную роль в определении ХС, поскольку он отсутствует в штаммах других биотипов агробактерий и мутанты по нему не способны вызывать на корнях винограда некрозы, а способность индуцировать опухоли у них снижена (Rodriguez-Palenzuela et al., 1991).

Способность большинства штаммов *A. vitis* к утилизации тартрата, которым изобилует виноград, в качестве единственного источника углерода, также может сказываться на ХС. Показано, что в отличие от штаммов *A. tumefaciens* биотипа I, штаммы биотипа II и *A. vitis* способны использовать L-тартрат как источник углерода, причем штаммы биотипа II предпочитают глюкозу тартрату, тогда как *A. vitis* утилизирует тартрат даже в присутствии глюкозы (Kerr, Panagopoulos, 1977; Szegedi, 1985). Этот признак контролируется плазмидой (Szegedi et al., 1992; Otten et al., 1995) и, возможно, является другим фактором ХС у *A. vitis*.

Ti-плазмиды, выявленные у *A. vitis*, можно разделить на 3 группы: октопин/кукумопинового, нопаинового и витопинового типов (Paulus et al., 1989b; Otten et al., 1992). Между плазмидами разных типов обнаружены различия по структуре Т-ДНК, вызванные встройками инсерционных элементов. На основе их распределения сделано заключение о том, что Ti-плазмиды октопин/кукумопинового типа, по-видимому, ассоциированы с определенным хромосомным фоном (Paulus et al., 1989a, 1989b). Вопрос о том, почему такие разные группы Ti-плазмид специфично ассоциированы с хромосомами штаммов биотипа III, очень интересен. Его дальнейшее изучение, несомненно расширит наше понимание взаимодействия между Ti-плазмидами и хромосомным фоном и поможет лучше контролировать распространение корончатогалловой болезни у винограда.

IV. Растительные факторы, определяющие специфичность агробактерий

Изменения, происходящие в растении в результате переноса Т-ДНК, определяются реакцией клеток на колебания уровня гормонов, связанные с экспрессией агробактериальных генов. Растительные факторы, контролирующие развитие опухолей, являются наименее изученными компонентами этого взаимодействия. Известно, что некие факторы растения-хозяина играют важную роль в определении ХС агробактерий, поскольку различия по чувствительности к трансформации обнаруживаются между родственными видами растений или даже различными сортами одного вида. Это явление интенсивно изучалось на примере винограда, гороха и сои (Owens, Cress, 1985; Hawes et al., 1989; Szegedi et al., 1989; Hobbs et al., 1989; Lowe, Krul, 1991). Показано, что устойчивость к опухолообразованию, вызываемому *A. vitis* на винограде *Vitis amurensis*, является доминантной (Szegedi, Kosma, 1984). Факт наличия видо- и, в некоторых случаях, генотип-специфичной устойчивости растений к трансформации указывает на взаимодействие факторов ХС агробактерий,

кодируемых плазмидными и хромосомными генами, с растительными факторами, о природе которых пока еще известно очень немного.

Несомненно, способность растения секретировать вещества, активирующие *vir*-гены, играет важную роль в определении круга хозяев *Agrobacterium*. Сообщалось о том, что некоторые не поддающиеся агротрансформации однодольные не секретируют индукторы *vir*-генов, в отличие от чувствительных к заражению двудольных растений (Usami et al., 1987), однако некоторые устойчивые растения все-таки синтезируют сильные индукторы (Usami et al., 1988; Messens et al., 1990). На способность бактерий заражать растение также влияют растительные метаболиты. Показано, что метаболит кукурузы (DIMBOA) является сильным ингибитором как роста клеток *A. tumefaciens*, так и индукции *vir*-генов (Sahi et al., 1990). Это, возможно, объясняет сложность получения трансформантов кукурузы с помощью агробактерий.

В контроль взаимодействия растения и бактерии может быть вовлечен растительный рецептор прикрепления агробактерии. Этот рецептор, по-видимому, является белком, поскольку обработка клеток моркови детергентом, трипсином или другими протеазами приводит к исчезновению сайтов прикрепления (Gurlitz et al., 1987). Показано, что в прикрепление агробактерий к растительным клеткам вовлечены витронектин-подобные белки (Wagner, Matthysse, 1992). Из клеточных стенок клеток корня гороха выделен предполагаемый гликопротеиновый рецептор, возможно, взаимодействующий с рикадгезином *A. tumefaciens* (Swart et al., 1994). Недавно сообщалось (Fullner et al., 1996), что помимо процессинга и переноса Т-ДНК, *vir*-гены отвечают и за образование пилей на бактериальной клетке. Результаты изучения аминокислотной последовательности белка VirB2 (Shirasu, Kado, 1993; Kado, 1994) позволяют говорить о том, что он является субъединицей пилина. Возможно, VirB2 выступает в роли адгезина, способствующего прочному прикреплению бактерии к растительной клетке. Было бы интересно узнать, имеют ли растения рецептор к VirB2 и могут ли вариации в его структуре влиять на чувствительность растений к агробактериям.

Показано, что растительные факторы влияют на трансформацию, а также на стадии взаимодействия, следующие за переносом Т-ДНК в растительную клетку. Так, у некоторых гиперчувствительных к радиации мутантов арабидопсиса обнаружен дефект на стадии интеграции Т-ДНК в хромосомы (Sonti et al., 1995). Насколько вышеописанные растительные факторы ответственны за видо- и генотип-специфичную устойчивость растений к трансформации, еще предстоит узнать. Но, несомненно, идентификация как можно большего количества растительных факторов, контролирующих устойчивость к заражению, будет способствовать лучшему пониманию механизмов ХС *Agrobacterium*.

V. Агротрансформация однодольных и других устойчивых растений: проблемы и успехи

Интенсивные исследования круга хозяев *A. tumefaciens* показали, что большинство голосеменных и двудольных растений формирует корончатые галлы, тогда как среди однодольных к этому способно лишь небольшое число видов (De Cleene, De Ley, 1976; De Cleene, 1985). Высказано предположение о том, что этот барьер связан с различиями в физиологии, анатомии и биохимии, существующими между дву- и однодольными растениями (Binns, Thomashow, 1988; Smith, Hood, 1995). Однако даже у самых чувствительных растений на развитие опухолей влияют возраст, тип клеток (стебли и листья), физиологическое состояние растения и способ заражения. Возможно, однодольные и не являются естественными хозяевами для агробактерий, но это не исключает переноса Т-ДНК в их клетки. Преимущества агротрансформации перед другими методами (Potrykus, 1990; Ishida et al., 1996; глава 17), а также экономическая важность некоторых однодольных, например злаков, заставили исследователей предпринять попытки по введению в однодольные ДНК с помощью агробактериальных векторов. В этих опытах были выявлены некоторые параметры, важные для трансформации однодольных.

К проблемным этапам трансформации, влияющим на ее эффективность, по крайней мере, у некоторых однодольных не относятся прикрепление бактерий к растительным клеткам или доступность индукторов *vir*-генов. Хотя прикрепление агробактерий к клеткам у одних однодольных рас-

тений происходит хуже, чем у других, были получены убедительные доказательства того, что агробактерии способны прикрепляться ко многим однодольным растениям, включая кукурузу и пшеницу, в той же степени, что и к двудольным (Lippincott, Lippincott, 1978; Draper et al., 1983; Douglas et al., 1985; Graves et al., 1988). Отсутствие индукторов *vir*-генов также не объясняет, почему некоторые однодольные растения устойчивы к трансформации, поскольку присутствие индукторов показано для целого ряда однодольных, хотя, конечно, некоторые виды, например, кукуруза, могут наряду с индукторами продуцировать и ингибиторы *vir*-генов (Usami et al., 1988; Messens et al., 1990; Sahi et al., 1990). Некоторые однодольные, такие как рис, способны к синтезу индукторов *vir*-генов только на определенной стадии развития или в определенной ткани.

Среди однодольных чувствительны к агротрансформации виды из семейств *Liliaceae* и *Amaryllidaceae* (De Cleene, De Ley, 1976; Hernalsteens et al., 1984; Hooykaas-Van Stogteren et al., 1984; De Cleene, 1985). В отличие от большинства однодольных, представители этих семейств легко вводятся в культуру тканей, а их раневой ответ сходен с таковым у двудольных растений (Hernalsteens et al., 1984; Bytebier et al., 1987). Обычно возможность введения растений в культуру хорошо коррелирует с чувствительностью к заражению агробактериями, поскольку в обоих случаях ключевыми факторами являются фитогормоны. В этом смысле неудивительно, что другое однодольное растение, *Commelina communis*, характеризующееся сходным с двудольными раневым ответом и доступностью для введения в культуру растительных клеток, с легкостью формировало опухоли с *A.tumefaciens* (Deng, Shao, 1989).

Таким образом, возможно, что только ограниченное число клеток в составе однодольного растения чувствительно к трансформации, или что перенос и встраивание Т-ДНК происходят, но опухоль не образуется из-за нечувствительности растительных тканей к изменениям уровня гормонов. Принципиальные различия в анатомии и расположении меристематических клеток, существующие между одно- и двудольными, а также характерная для клеток однодольных растений тенденция к потере способности к дедифференцировке на ранних стадиях развития могут быть причинами того, что большинство однодольных не формирует опухолей в ответ на агробактериальную инфекцию (Graves et al., 1988; Smith, Hood, 1995). К настоящему времени у некоторых злаковых (кукуруза, рис, ячмень, пшеница) удалось индуцировать опухоли с помощью штаммов *A. tumefaciens* дикого типа (Graves, Goldman, 1988; Deng et al., 1990; Rainery et al., 1990). Ключом к успеху оказалась инокуляция агробактериями меристематических районов или тканей, способных к дедифференцировке. С помощью метода агроинфекции показано, что апикальная меристема проростков кукурузы чувствительна к заражению (Grimsley et al., 1988). Именно применение метода агроинфекции показало, что *A. tumefaciens* способна переносить Т-ДНК в клетки многих, если не всех, злаков и трав, включая рис, пшеницу, лук и овес (Donson et al., 1988; Woolston et al., 1988; Dommis et al., 1990; Dasgupta et al., 1991). Сходным образом показана чувствительность верхушек побегов кукурузы к трансформации Т-ДНК (Gould et al., 1991; Shen et al., 1993). На необходимость использования меристематических или эмбриональных тканей при трансформации «трудных» видов указывают также опыты по трансформации риса (Raineri et al., 1990; Chan et al., 1993). При трансформации некоторых видов однодольных эффективным оказалось добавление фенольных соединений или раневых экссудатов двудольных растений в момент совместного культивирования агробактерий с растительной тканью, что указывает на недостаточность содержания в этих растениях индукторов *vir*-генов (Schafer et al., 1987; Chan et al., 1993). Хотя сообщается о все возрастающем числе видов однодольных, чувствительных к агробактериям (Smith, Hood, 1995), опыты такого типа подвергаются критике со стороны исследователей, считающих, что необходимые для их продолжения молекулярные и генетические данные отсутствуют (Potrykus, 1990). Оправдание подобных опытов получено недавно в связи с успешной трансформацией кукурузы и риса.

Группа японских исследователей из Japan Tobacco Inc. сообщила о высокоэффективной агротрансформации некоторых сортов риса и кукурузы (Hiei et al., 1994; Ishida et al., 1996). Ими получены сотни фертильных трансгенных растений при эффективности трансформации, сравнимой с таковой у двудольных, причем менделевское наследование трансгенов подтверждено с помощью генетического и молекулярного анализа. Успех именно этой группы исследователей связан с

целым рядом факторов, ранее по отдельности изучавшихся в опытах по трансформации других одно- и двудольных растений. Это выбор растительного материала, условий культивирования, бактериальных штаммов, векторов и селективных маркеров. К наиболее важным факторам можно отнести использование активно делящихся, чаще всего эмбриональных, тканей для инфекции, добавление индукторов *vir*-генов и инокуляцию супервирулентным агробактериальным штаммом (Hood et al., 1986; Jin et al., 1987; Komari, 1990; Hiei et al., 1994; Ishida et al., 1996). Однако некоторые генотипы риса и кукурузы были достоверно более устойчивы к трансформации, чем другие (Hiei et al., 1994; Ishida et al., 1996). С использованием по-разному модифицированных векторов показано, что эффективность трансформации кукурузы может сильно варьировать (Hansen et al., 1994). Эти исследования четко указывают на то, что механизм переноса Т-ДНК в клетки однодольных при заражении агробактерией такой же, как и в случае двудольных.

Необходимо отметить, что успех достигнут и для некоторых других «трудно» трансформируемых, но важных в хозяйственном отношении видов, таких как горох и маниок (Schroeder et al., 1993; Shade et al., 1994; Li et al., 1996). Использование эмбрионной суспензионной культуры в качестве материала для совместного культивирования способствовало разработке эффективного протокола для трансформации райграса (*Lolium perenne*, *L. multiflorum*). Не является простым совпадением и то, что прежде, чем был достигнут успех в трансформации, для этих видов были разработаны эффективные методики введения в культуру тканей. Единственной проблемой в получении трансгенных растений у перечисленных видов осталось преодоление сортовой устойчивости к трансформации.

VI. Заключение

В течение последних двадцати лет наши знания о механизме, с помощью которого *Agrobacterium* индуцирует появление на растении корончатых галлов, значительно расширились. Прогресс достигнут и в выявлении факторов хозяйской специфичности (хромосомных генов, Тi-плазмидных детерминант и растительных факторов). Мы теперь признаем, что эффективность инфицирования агробактериями можно повысить за счет создания лучших векторов, модификаций процедуры заражения и условий культивирования растительных тканей. Расширение знаний о биологии и хозяйской специфичности агробактерий уже привело к получению трансгенных растений важных сельскохозяйственных культур, включая кукурузу и рис, ранее считавшихся устойчивыми к трансформации. Мы сейчас можем использовать агробактериальные векторы для трансформации большинства, если не всех, хозяйственно-ценных видов.

Для того, чтобы это произошло как можно скорее, необходимы дополнительные знания о растительном контроле трансформации. Также нам необходимо знать больше о биологии растительных тканей в условиях культуры для разработки эффективных протоколов регенерации, а, следовательно, и получения большего числа трансгенных растений. Без этого преодоление сортового барьера трансформации не будет возможным. Однако если мы сумеем извлечь уроки из работ по трансформации кукурузы, риса и других культурных растений, и не остановимся на достигнутом, то, в конце концов, не останется растений, нечувствительных к *Agrobacterium*!

VII. Литература

- Akiyoshi D.E., Regier D.A., Gordon M.P. (1987) J. Bacteriol. V. 169, p. 4242-4248.
 Akiyoshi D.E., Regier D.A., Jen G., Gordon M.P. (1985) Nucleic Acids Res. V. 13, p. 2773-2788.
 Anderson A., Moore L. (1979) Phytopathology. V. 69, p. 320-323.
 Ankenbauer R.G., Best E.A., Palanca C.A., Nester E.W. (1991) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 4, p. 400-406.
 Beaty J.S., Powell G.K., Lica L., Regier D.A., MacDonald E.M.S., Homines N.G., Morris R.O. (1986) Mol. Gen. Genet. V. 203, p. 274-280.
 Binns A.N., Thomashow M.F. (1988) Annu. Rev. Microbiol. V. 42, p. 575-606.
 Boulton M.I., Buchholz W.G., Maiks M.S., Markham P.O., Davies J.W. (1989) Plant Mol. Biol. V. 12, p. 31-40.
 Buchholz W.G., Thomashow M.F. (1984) J. Bacteriol. V. 160, p. 327-332.
 Bundock P., den Dulk-Ras A., Beijersbergen A., Hooykaas P.J.J. (1995) EMBO J. V. 14, p. 3206-3214.
 Burr T.J., Bishop A.L., Katz B.H., Blanchard L.M., Bazzi C. (1988) Phytopathology. V. 77, p. 1424-1427.

- Burr T.J., Katz B.H., Bishop A.L. (1987) Plant Dis. V. 71, p. 617-620.
- Bytebier B., Deboeck F., Greve H.D., Van Montagu M., Hernalsteens J.P. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 84, p. 5345-5349.
- Cangelosi G.A., Ankenbauer R.G., Nester E.W. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 87, p. 6708-6712.
- Cangelosi G.A., Hung L., Puvanesarajah V., Stacey G., Ozga D.A., Leigh J.A., Nester E.W. (1987) J. Bacteriol. V. 169, p. 2086-2091.
- Castle L.A., Smith K.D., Morris R.O. (1992) J. Bacteriol. V. 174, p. 1478-1486.
- Chan M.T., Chang H.H., Ho S.L., Tong W.F., Yu S.M. (1993) Plant Mol. Biol. V. 22, p. 491-506.
- Charles T., Nester E.W. (1993) J. Bacteriol. V. 175, p. 6614-6625.
- Christie P.J., Ward J.E., Winans S.C., Nester E.W. (1988) J. Bacteriol. V. 170, p. 2659-2667.
- Citovsky V., Zupan J., Warnick D., Zambryski P. (1992) Science. V. 256, p. 1802-1805.
- Close T.J., Rogowsky P.M., Kado C.I., Winans S.C., Yanofsky M.F., Nester E.W. (1987) J. Bacteriol. V. 169, p. 5113-5118.
- Cooley M.B., D'Souza M.R., Kado C.I. (1991) J. Bacteriol. V. 173, p. 2608-2616.
- Culianez-Macia F.A., Hepburn A.G. (1988) Plant Mol. Biol. V. 11, p. 389-399.
- Dasgupta I., Hull R., Eastop S., Poggi-Pollini C., Blakebrough M., Boulton M.I., Davies J.W. (1991) J. Gen. Virol. V. 72 (Pt 6), p. 1215-1221.
- De Cleene M. (1985) Phytopath. Z. V. 113, p. 81-89.
- De Cleene M., De Ley J. (1976) Bot. Rev. V. 42, p. 389-466.
- Deng W., Gordon M.P., Nester E.W. (1995a) J. Bacteriol. V. 177, p. 2554-2559.
- Deng W., Lin X., Shao Q. (1990) Science in China (Series B) (English Edition). V. 33, p. 27-33.
- Deng W., Pu X.A., Goodman R.N., Gordon M.P., Nester E.W. (1995b) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 8, p. 538-548.
- Deng W., Shao Q. (1989) Chinese Science Bulletin (English Edition). V. 34, p. 1815-1819.
- De Vos G.D., Zambryski P. (1989) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 2, p. 43-52.
- Domisse E.M., Leung D.W.M., Shaw M.L., Conner A.J. (1990) Plant Sci. V. 69, p. 249-257.
- Denson J., Gunn H.V., Woolston C.J., Pinner M.S., Boulton M.I., Mullineaux P.M., Davies J.W. (1988) Virology. V. 162, p. 248-250.
- Doty S.L., Yu M.C., Lundin J.I., Heath J.D., Nester E.W. (1996) J. Bacteriol. V. 178, p. 961-970.
- Douglas C., Halperin W., Gordon M.P., Nester E.W. (1985) J. Bacteriol. V. 161, p. 764-766.
- Douglas C., Halperin W., Nester E.W. (1982) J. Bacteriol. V. 152, p. 1265-1275.
- Draper J., Mackenzie I.A., Davey M.R., Freeman J.P. (1983) Plant Sci. Lett. V. 29, p. 227-236.
- D'Souza-Ault M., Cooley M., Kado C.I. (1993) J. Bacteriol. V. 175, p. 3486-3490.
- Fullner K.J., Lara J.C., Nester E.W. (1996) Science. V. 273, p. 1107-1109.
- Gardner R.C., Knauf V.C. (1986) Science. V. 231, p. 725-727.
- Gould J., Devcy M., Hasegawa O., Ulian E.G., Peterson G., Smith R.H. (1991) Plant Physiol. V. 95, p. 426-434.
- Graves A.E., Goldman S.L. (1986) Plant Mol. Biol. V. 7, p. 43-50.
- Graves A.E., Goldman S.L., Banks S.W., Graves A.C.F. (1988) J. Bacteriol. V. 170, p. 2395-2400.
- Gray J., Wang J., Gelvin S. (1992) J. Bacteriol. V. 174, p. 1086-1098.
- Grimsley N., Hohn B., Ramos C., Kado C., Rogowsky P. (1989) Mol. Gen. Genet. V. 217, p. 309-316.
- Grimsley N., Hohn T., Davis J.W., Hohn B. (1987) Nature. V. 325, p. 177-179.
- Grimsley N., Hohn B., Hohn T., Walden R. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 83, p. 3282-3286.
- Grimsley N., Ramos C., Hein T., Hohn B. (1988) Biotechnology. V. 6, p. 185-189.
- Gurlitz R.H.G., Lamb P.W., Matthysse A.G. (1987) Plant Physiol. V. 83, p. 564-568.
- Hamada S.E., Farrand S.K. (1980) J. Bacteriol. V. 144, p. 732-743.
- Hansen G., Das A., Chilton M.D. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 91, p. 7603-7607.
- Hawes M.C., Robbs S.L., Pueppke S.G. (1989) Plant Physiol. V. 90, p. 180-184.
- Hernalsteens J.P., Thia-Toong L., Schell J., Van Montagu M. (1984) EMBO J. V. 3, p. 3039-3041.
- Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. (1994) Plant J. V. 6, p. 271-282.
- Hille J., van Kan J., Schilperoort R. (1984) J. Bacteriol. V. 158, p. 754-756.
- Hirooka T., Rogowsky P.M., Kado C.I. (1987) J. Bacteriol. V. 169, p. 1529-1536.
- Hobbs S.L.A., Jackson J.A., Mahon J.D. (1989) Plant Cell Rep. V. 8, p. 274-277.
- Hoekema A., de Pater B.S., Fellinger A.J., Hooykaas P.J.J., Schilperoort R.A. (1984) EMBO J. V. 3, p. 3043-3047.
- Hood E.E., Helmer G.L., Fraley R.T., Chilton M.D. (1986) J. Bacteriol. V. 168, p. 1291-1301.
- Hood E.E., Fraley R.T., Chilton M.D. (1987) Plant Physiol. V. 83, p. 529-534.
- Hooykaas P.J.J., Beijersbergen A.G.M. (1994) Annu. Rev. Phytopathol. V. 32, p. 157-179.
- Hooykaas P.J.J., den Dulk-Ras H., Schilperoort R.A. (1988) Plant Mol. Biol. V. 11, p. 791-794.
- Hooykaas P.J.J., Hofker M., den Dulk-Ras H., Schilperoort R.A. (1984) Plasmid. V. 11, p. 195-205.
- Hooykaas P.J.J., Schilperoort R.A. (1986) In: B. Lugtenberg (ed.), Recognition in microbe-plant symbiotic and pathogenic interactions. Springer-Verlag, Berlin, pp. 189-202.
- Hooykaas-Van Slogteren G.M.S., Hooykaas P.J.J., Schilperoort R.A. (1984) Nature. V. 311, p. 763-764.
- Horsch R.B., Klee H.J., Stachel S., Winans S.C., Nester E.W., Rogers S.G., Fraley R.T. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 83, p. 2571-2575.
- Horvath B., Bachem C.W.B., Schell J., Kondorosi A. (1987) EMBO J. V. 6, p. 841-848.
- Huang M.L.W., Cangelosi G.A., Halperin W., Nester E.W. (1990) J. Bacteriol. V. 172, p. 1814-1822.

- Ishida Y., Saito H., Ohta S., Hici Y., Komari T., Kumashiro T. (1996) *Nature Biotechnology*. V. 14, p. 745-750.
- Jarchow E., Grimsley N.H., Hohn B. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 88, p. 10426-10430.
- Jin S., Komari T., Gordon M.P., Nester E.W. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 4417-4425.
- Jin S., Song Y.N., Deng W., Gordon M.P., Nester E.W. (1993a) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 6830-6835.
- Jin S., Song Y.N., Pan S.Q., Nester E.W. (1993b) *Mol. Microbiol.* V. 7, p. 555-562.
- John M.C., Amasino R.M. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 790-795.
- Kado C.I. (1994) *Mol. Microbiol.* V. 12, p. 17-22.
- Kalogeraki V.S., Winans S.C. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 892-897.
- Kanemoto R.H., Powell A.T., Akiyoshi D.E., Regier D.A., Kerstetter R.A., Nester E.W., Hawes M.C., Gordon M.P. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 2506-2512.
- Kang H.W., Wirawan I.G.P., Kojima M. (1994) *Biosci. Biotech. Biochem.* V. 58, p. 2024-2032.
- Kerr A. (1992) In: Balows K. et al. (ed.). *The prokaryotes*, 2nd edition, Vol. III. Springer-Verlag, Berlin, p. 2214-2235.
- Kerr A., Panagopoulos C.G. (1977) *Phytopathol. Z.* V. 90, p. 172-179.
- Klec H.J., White F.F., Iyer V.N., Gordon M.P., Nester E.W. (1983) *J. Bacteriol.* V. 153, p. 878-883.
- Knauf V.C., Panagopoulos C.G., Nester E.W. (1982) *Phytopathology*. V. 72, p. 1545-1549.
- Komari T. (1990) *Plant Cell Rep.* V. 9, p. 303-306.
- Kovacs L.G., Pueppke S.G. (1993) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 6, p. 601-608.
- Kovacs L.G., Pueppke S.G. (1994) *Mol. Gen. Genet.* V. 242, p. 327-336.
- Lee Y.W., Jin S., Sim W.S., Nester E.W. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 92, p. 12245-12249.
- Leroux B., Yanofsky M.F., Winans S.C., Ward J.E., Ziegler S.F., Nester E.W. (1987) *EMBO J.* V. 6, p. 849-856.
- Li H.Q., Sautter C., Potrykus I., Puonti-Kaerlas J. (1996) *Nature Bio/technology*. V. 14, p. 736-740.
- Lippincott B.B., Lippincott J.A. (1969) *J. Bacteriol.* V. 97, p. 820-828.
- Long S.R. (1989) *Cell*. V. 56, p. 203-214.
- Loper J.E., Kado C.I. (1979) *J. Bacteriol.* V. 139, p. 591-596.
- Lowe B.A., Krul W.R. (1991) *Plant Physiol.* V. 96, p. 121-129.
- Mantis N., Winans S.C. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 6626-6636.
- Matthysse A.G. (1983) *J. Bacteriol.* V. 154, p. 906-915.
- Matthysse A.G. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 313-323.
- Melchers L.S., Maroney M.J., den Dulk-Ras A., Thompson D.V., van Vuuren H.A.J., Schilperoort R.A., Hooykaas P.J.J. (1990) *Plant Mol. Biol.* V. 14, p. 149-159.
- Melchers L.S., Thompson D.V., Idler K.B., Neuteboom S.T.C., de Maagd R.A., Schilperoort R.A., Hooykaas P.J.J. (1987) *Plant Mol. Biol.* V. 9, p. 635-645.
- Messens E., Dekeyser R., Stachel S.E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 87, p. 4368-4372.
- Metts J., West J., Doares S., Matthysse A. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 1080-1087.
- Miller H.N. (1975) *Phytopathology*. V. 65, p. 805-811.
- Minnemeyer S.L., Lightfoot R., Matthysse A.G. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 7723-7724.
- Morris J.W., Morris R.O. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 87, p. 3614-3618.
- Nugent J.M., Palmer J.D. (1991) *Cell*. V. 66, p. 473-481.
- O'Connell K.P., Handelsman J. (1989) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 2, p. 11-16.
- Otten L., Canaday J., Gerard J.C., Fournier P., Crouzet P., Paulus F. (1992) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 5, p. 279-287.
- Otten L., Crouzet P., Salomone J.Y., de Ruffray P., Szegedi E. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 138-146.
- Otten L., De Greve H., Leemans J., Hain R., Hooykaas P., Schell J. (1984) *Mol. Gen. Genet.* V. 195, p. 159-163.
- Owens L.D., Cress D.E. (1985) *Plant Physiol.* V. 77, p. 87-94.
- Pan S.Q., Jin S.G., Boulton M.I., Hawes M., Gordon M.P., Nester E.W. (1995) *Mol. Microbiol.* V. 17, p. 259-269.
- Panagopoulos C.G., Psallidas P.O. (1973) *J. Appl. Bacteriol.* V. 36, p. 233-240.
- Panagopoulos C.G., Psallidas P.G., Alivazatos A.S. (1978) In: *Proc. 4-th Int. Conf. Plant Pathol. Bacteria*, Angers, France, p. 221-228.
- Paulus F., Huss B., Tinland B., Herrmann A., Canaday J., Otten L. (1991) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 4, p. 163-172.
- Paulus F., Huss B., Tinland B., Ride M., Szegedi E., Tempe J., Petit A., Otten L. (1989b) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 2, p. 64-74.
- Paulus F., Ride M., Otten L. (1989a) *Mol. Gen. Genet.* V. 219, p. 145-152.
- Pazour G.J., Ta C.V., Das A. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 4169-4174.
- Peralta E.G., Hellmiss R., Ream W. (1986) *EMBO J.* V. 5, p. 1137-1142.
- Peralta E.G., Ream W. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 82, p. 5112-5116.
- Perry K.L., Kado C.I. (1982) *J. Bacteriol.* V. 151, p. 343-350.
- Piers K., Heath J.D., Liang X., Stephens K.M., Nester E.W. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 93, p. 1613-1618.
- Potrykus I. (1990) *Bio/technology*. V. 8, p. 535-542.
- Powell G.K., Hommes N.G., Kuo J., Castle L.A., Morris R.O. (1988) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 1, p. 235-242.
- Pu X.A., Goodman R.N. (1992) *Physiol. Mol. Plant Pathol.* V. 41, p. 241-254.
- Puvanesarajah V., Schell P.M., Stacey G., Douglas C.J., Nester E.W. (1985) *J. Bacteriol.* V. 164, p. 102-106.
- Raineri D.M., Bottino P., Gordon M.P., Nester E.W. (1990) *Bio/technology*. V. 8, p. 33-38.
- Raineri D.M., Boulton M.I., Davies J.W., Nester E.W. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 90, p. 3549-3553.
- Regensburg-Tuink A.J.G., Hooykaas P.J.J. (1993) *Nature*. V. 363, p. 69-71.

- Rodriguez-Palenzuela P., Burr T.J., Collmer A. (1991) J. Bacteriol. V. 173, p. 6547-6552.
- Sahi S.V., Chilton M.D., Chilton W.S. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 87, p. 3879-3883.
- Schafer W., Gorz A., Kahl G. (1987) Nature. V. 327, p. 529-532.
- Schroeder H.E., Schotz A.H., Wardley-Richardson T., Spencer D., Higgins T.J.V. (1993) Plant Physiol. V. 101, p. 751-757.
- Sciaky D., Montoya A., Chilton M.D. (1978) Plasmid. V. 1, p. 238-253.
- Shade R.E., Schroeder H.E., Pueyo J.J., Tabe L.M., Murdock L.L., Higgins T.J.V., Chrispeels M.J. (1994) Bio/technology. V. 12, p. 793-796.
- Shen W.H., Escudero J., Schlappi M., Ramos C., Hohn B., Koukolikova-Nicola Z. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 90, p. 1488-1492.
- Shimoda N., Toyoda-Yamamoto A., Aoki S., Machida Y. (1993) J. Biol. Chem. V. 268, p. 26552-26558.
- Shimoda N., Toyoda-Yamamoto A., Nagamine J., Usami S., Katayama M., Sakagami Y., Machida Y. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 87, p. 6684-6688.
- Shirasu K., Kado C.I. (1993) FEMS Microbiol. Lett. V. 111, p. 287-294.
- Smith R.H., Hood E.E. (1995) Crop Sci. V. 35, p. 301-309.
- Sonti R.V., Chiurazzi M., Wong D., Davies C.S., Harlow G.R., Mount D.W., Signer E.R. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 92, p. 11786-11790.
- Spaink H.P., Wijffelman C.A., Pees E., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1987) Nature. V. 328, p. 337-340.
- Spencer P.A., Tanaka A., Towers G.H.N. (1990) Phytochemistry. V. 29, p. 3785-3788.
- Stachel S.E., Nester E.W. (1986) EMBO J. V. 5, p. 1445-1454.
- Swart S., Logman T.J.J., Lugtenberg B.J.J., Smit G., Kijne J.W. (1994a) Arch. Microbiol. V. 161, p. 310-315.
- Swart S., Logman T.J.J., Smit G., Lugtenberg B.J.J., Kijne J.W. (1994c) Plant Mol. Biol. V. 24, p. 171-183.
- Swart S., Lugtenberg B.J.J., Smit G., Kijne J.W. (1994b) J. Bacteriol. V. 176, p. 3816-3819.
- Szegedi E. (1985) Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung. V. 20, p. 17-22.
- Szegedi E., Korbuly J., Otten L. (1989) Physiol. Mol. Plant Pathol. V. 35, p. 35-43.
- Szegedi E., Kozma P. (1984) Vitis. V. 23, p. 121-126.
- Szegedi E., Otten L., Czako M. (1992) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 5, p. 435-438.
- Thomashow M.F., Karlinsey J.E., Marks J.R., Hurlbert R.E. (1987) J. Bacteriol. V. 169, p. 3209-3216.
- Thomashow M.F., Panagopoulos C.G., Gordon M.P., Nester E.W. (1980) Nature. V. 283, p. 794-796.
- Toro N., Datta A., Carmi O.A., Young C., Prusti R.K., Nester E.W. (1989b) J. Bacteriol. V. 171, p. 6845-6849.
- Toro N., Datta A., Yanofsky M., Nester E.W. (1989a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 85, p. 8558-8562.
- Turk S., Nester E., Hooykaas P. (1993) Mol. Microbiol. V. 7, p. 719-724.
- Turk S.C.H.J., Melchers L.S., den Dulk-Ras H., Regensburg-Tuink A.J.G., Hooykaas P.J.J. (1991) Plant Mol. Biol. V. 16, p. 1051-1059.
- Unger L., Ziegler S.F., Huffman G.A., Knauf V.C., Peel R., Moore L.W., Gordon M.P., Nester E.W. (1985) J. Bacteriol. V. 164, p. 723-730.
- Usami S., Morikawa S., Takebe I., Machida Y. (1987) Mol. Gen. Genet. V. 209, p. 221-226.
- Usami S., Okamoto S., Takebe I., Machida Y. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 85, p. 3748-3752.
- Uttaro A.D., Cangelosi G.A., Geremia R.A., Nester E.W., Ugalde R.A. (1990) J. Bacteriol. V. 172, p. 1640-1646.
- Wagner V.T., Matthysse A.G. (1992) J. Bacteriol. V. 174, p. 5999-6003.
- White F.F., Taylor B.H., Huffman G.A., Gordon M.P., Nester E.W. (1985) J. Bacteriol. V. 164, p. 33-44.
- Winans S.C., Kerstetter R.A., Nester E.W. (1988) J. Bacteriol. V. 170, p. 4047-4054.
- Wirawan I.G.P., Kang H.W., Kojima M. (1993) J. Bacteriol. V. 175, p. 3208-3212.
- Woolston C.J., Barker R., Gunn H., Boulton M.I., Mullineaux P.M. (1988) Plant Mol. Biol. V. 11, p. 35-43.
- Xu D., Li B., Liu Y., Huang Z., Gu L. (1996) Science in China (Series C). V. 39, p. 8-16.
- Yanofsky M., Lowe B., Montoya A., Rubin R., Krul W., Gordon M., Nester E. (1985a) Mol. Gen. Genet. V. 201, p. 237-246.
- Yanofsky M., Montoya A., Knauf V., Lowe B., Gordon M., Nester E. (1985b) J. Bacteriol. V. 163, p. 341-348.
- Zhan X., Jones D.A., Kerr A. (1990) Plant Mol. Biol. V. 14, p. 785-792.
- Zorreguieta A., Geremia R.A., Cavaignac S., Cangelosi G.A., Nester E.W., Ugalde R.A. (1988) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 1, p. 121-127.

Использование агробактерий в генной инженерии растений

Д'Халльон К., Боттерман Й.

I.	Введение.....	365
II.	Векторные конструкции.....	365
III.	Методы.....	366
IV.	Преимущества агробактериальной трансформации по сравнению с прямым переносом генов.....	367
V.	Молекулярное маркирование генов.....	367
VI.	Гены-мишени. Направленный мутагенез.....	368
VII.	Применение агробактериальной трансформации для получения генноинженерных растений с новыми признаками.....	368
VIII.	Литература.....	370

I. Введение

Agrobacterium tumefaciens и *A. rhizogenes* - почвенные патогенные бактерии, которые индуцируют на растениях заболевания «корончатый галл» и «волосатый корень», соответственно. В процессе инфекции специфический сегмент из опухолообразующей (Ti) или корнеобразующей (Ri) плазмид, Т-ДНК, переносится из бактерии в растительные клетки с последующей его интеграцией и экспрессией в растительном геноме. Т-ДНК содержит гены, кодирующие: 1) ферменты биосинтеза фитогормонов (*onc*-гены), которые приводят к пролиферации клеток и формированию «корончатых галлов» и «волосатых корней», и 2) продукцию опинов, которые используются как источник питания для бактерий. Т-ДНК - район Ti-плазмиды, который фланкирован прямыми повторами по 25 п.н., необходимыми для вырезания и переноса Т-ДНК в растительные клетки (Zambryski, 1992). Вырезание и перенос Т-ДНК контролируется генами *vir*, локализованными за границами Т-ДНК. Система переноса ДНК на основе агробактерий используется для создания векторных систем и введения генных конструкций в различные виды растений.

II. Векторные конструкции

Поскольку гены Т-ДНК не участвуют в переносе, они могут быть делетированы и заменены генами, представляющими интерес для исследователей (Zambryski et al., 1983). Такие «обезоруженные» векторы, содержащие только пограничные районы Т-ДНК и интродуцированную ДНК, сравнимую по размеру с Т-ДНК, переносят в растительный геном (рис. 1). Коинтегративные вектора конструируют таким образом, что интересующий исследователя ген, клонированный в плазмиде *Escherichia coli*, интегрируется в Т-ДНК путем гомологичной рекомбинации (Deblaere et al., 1985). Кроме того, используют бинарные векторные системы, в которых агробактериальные штаммы несут две плазмиды. Одна плазмида имеет: 1) селективный маркер для размножения в бактерии-хозяине, 2) сайт для клонирования между границами Т-ДНК, 3) ориджины репликации, которые позволяют плазмиде поддерживаться в *E. coli* и *Agrobacterium*. Гены вирулентности, необходимые для переноса Т-ДНК, находятся на вспомогательной Ti-плазмиде (Hoekema et al., 1983).

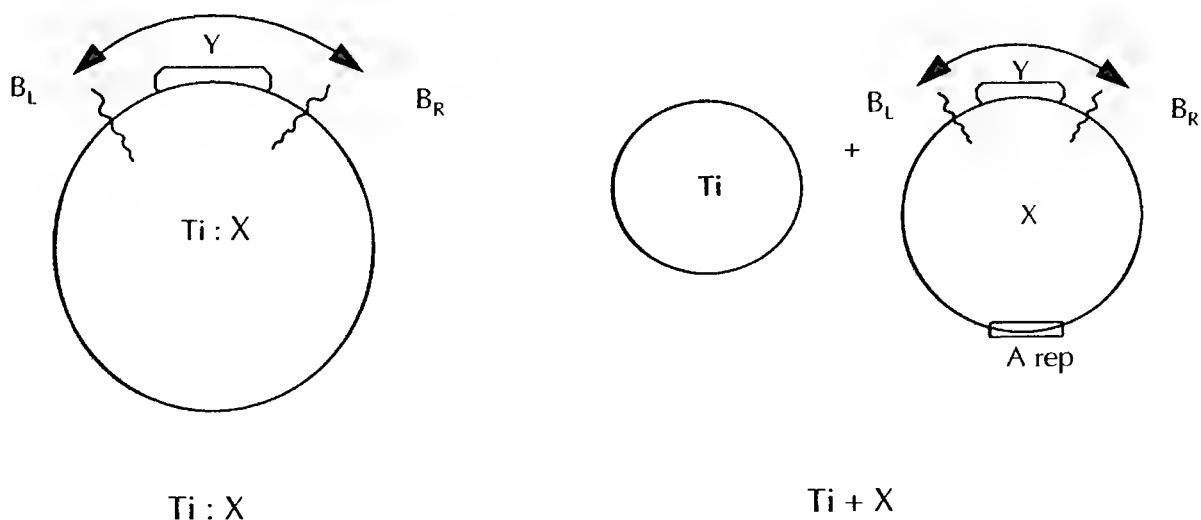


Рисунок 1. Конструкция вектора.

Ti : X - коинтеграционный вектор Ti + X - бинарная векторная система; A rep: Agro репликон; y: переносимый ген; B_L: левая граница; B_R: правая граница.

Были созданы модифицированные бинарные векторы, несущие гены супервирулентности штамма A281 (Komari et al., 1990; Saito et al., 1992; Hiei et al., 1994) или две разные Т-ДНК (Komari et al., 1996). Во втором случае использовали спейсер между двумя последовательностями Т-ДНК из района вирулентности pTiBo542 (Komari et al., 1986) и с помощью такого вектора получали свободные от маркеров растения. При использовании этих векторов достигнута высокая частота ко-трансформации несцепленных локусов (Komari et al., 1996).

Как правило, большинство конструкций содержит менее чем 25 т.п.н. между границами Т-ДНК. Описан бинарный бактериальный искусственный хромосомный вектор ВІВАС (от англ.: «binary bacterial artificial chromosome»), способный переносить последовательность чужеродной ДНК из более чем 150 т.п.н. в ядерный геном табака (Hamilton et al., 1990).

III. Методы

Использование векторов на основе *Agrobacterium* является рутинным и широко распространенным методом переноса чужеродных генов в двудольные растения. Метод переноса Т-ДНК относительно прост, не требует получения протопластов и обеспечивает интродукцию ДНК в растительные ткани. При этом используют модификации метода листовых дисков (Horsch et al., 1985). Рассеченные ткани листа, корней, стебля, hypocotyle, сегменты семядолей, эмбрионный или органогенный каллус, а также семена могут быть использованы как исходный материал для совместного культивирования с агробактериями. Для арабидопсиса также описана агробактериальная трансформация *in planta* (Bechtold et al., 1993; Feldmann et al., 1994). Некоторые гены, представляющие интерес для исследователей, были перенесены в Т-ДНК и соответствующие конструкции использованы для трансформации широкого круга двудольных растений. Однако многочисленные попытки стабильной трансформации злаков были безуспешными. Недавно показано (Hiei et al., 1994), что агробактериальную стратегию можно успешно использовать и для трансформации риса. Высокая частота агробактериальной трансформации (10-30%) получена при использовании в качестве первичных эксплантов каллусов из покровной (scutellum) ткани. В настоящее время используют усовершенствованный (супербинарный) вектор, который включает фрагмент района вирулентности плазмиды pTiBo542, содержит ген *virG* и 3'-конец гена *virB*. Этот вектор успешно ис-

пользован и для стабильной трансформации кукурузы (Ishida et al., 1996). Возможно, дальнейшее изучение переноса ДНК при помощи агробактериальной трансформации и разработка новых векторных систем и методов культуры тканей приведут к широкому использованию агробактерий для трансформации злаков.

IV. Преимущества агробактериальной трансформации по сравнению с прямым переносом генов

Долгое время полагали, что однодольные растения не восприимчивы к агробактериям, и поэтому разрабатывали альтернативные методы трансформации, основанные на прямом переносе ДНК в клетки и ткани. Хотя такие методы в настоящее время вполне доступны, возможность использования агробактериальной трансформации для основных видов злаков все еще остается весьма актуальной (Chilton, 1993).

Главные преимущества агробактериальной трансформации заключаются в следующем: 1) фрагменты ДНК, заключенные между границами Т-ДНК, переносятся в клетки, 2) могут быть перенесены относительно большие участки ДНК, объединенные в сцепленные генные конструкции, 3) характер интеграции относительно прост и с довольно высокой частотой происходит включение одной копии, что значительно снижает уровень метилирования и сайленсинга, 4) в процессе интеграции в ДНК не происходит перестроек. В настоящее время четко установлено, что интегрированная Т-ДНК наследуется при скрещиваниях растений согласно менделевской схеме. Агробактериальная трансформация значительно отличается от методов прямого переноса генов, которые, как правило, приводят к формированию трансформантов с множественными вставками (копиями генов). Кроме того, нефункциональные участки гена и части самого вектора часто объединяются случайным образом и интегрируются в геном. В этих случаях можно наблюдать необычный характер сегрегации или отсутствие наследования интегрированных фрагментов (Walters et al., 1990; Register et al., 1994). Эти результаты значительно усложняют оценку трансгенных форм в используемых генетических программах. Кроме того, согласно требованиям, предъявляемым к трансгенным продуктам, сложный характер интеграции создает дополнительные трудности для получения разрешения на их применение. Только для растений с простым типом интеграции и не несущих нежелательной ДНК можно получить такое разрешение, тогда как многие трансформанты, полученные путем прямого переноса ДНК, по указанным причинам отвергаются. Кроме того, для отбора трансформантов с адекватно встроенной ДНК, полученных методом прямого переноса генов, необходимо получить значительно большее количество трансгенных растений, чем при агробактериальной трансформации.

V. Молекулярное маркирование генов

Для проведения инсерционного мутагенеза необходимо получить большое количество независимых трансформантов. Для создания большого числа линий арабидопсиса, маркированных Т-ДНК, использовали высокоэффективные методы агротрансформации (Koncz et al., 1992; Feldmann et al., 1994). Интеграция Т-ДНК в растительный геном может быть использована для идентификации промоторов растительных генов. В этом случае используются конструкции, в которых репортерный ген слит с регуляторными растительными последовательностями. Идентификация промоторов становится возможной, поскольку Т-ДНК интегрируется преимущественно в активно транскрибируемые районы растительного генома (Koncz et al., 1989; Kertbundit et al., 1991; Mandal et al., 1993). Так, промоторные последовательности, которые непосредственно определяют характер экспрессии гена, могут быть маркированы с помощью инсерции Т-ДНК, которая включает структурную (без промотора) часть гена *gus* (Lindsey et al., 1993). Например, показана возможность маркирования промоторов генов, реагирующих на заражение арабидопсиса нематодой, с использованием агробактериального вектора, содержащего ген *gus* без промотора, встроенного вблизи границ Т-ДНК (Goddijn et al., 1993).

В переносимую конструкцию можно поместить также энхансерные элементы (усилители транскрипции), которые изменяют уровень экспрессии генов, фланкирующих район встройки (энхансера) этой конструкции. Это приводит к появлению доминантных мутаций. Такой подход использован для выделения генов, контролирующих передачу ауксинового сигнала (Walden et al., 1994) и модификацию биосинтеза полиаминов (Fritze et al., 1995).

VI. Гены-мишени. Направленный мутагенез

Показано, что среди независимо полученных трансформантов существует изменчивость в уровне экспрессии интродуцированных генов. Эта изменчивость является результатом интеграции Т-ДНК в разные участки генома растения, то есть эффекта положения (Jones et al., 1985). Один из возможных подходов, позволяющих преодолеть изменчивость в уровне экспрессии трансгенов, это интродукция генных конструкций в специфический район растительного генома. В этом случае экспрессия интродуцированных генов была бы качественно и количественно более воспроизводима. К сожалению, интродукция гена в геном растений путем гомологичной рекомбинации не эффективна (Lee et al., 1990; Halfter et al., 1992; Offringa et al., 1993; Morton et al., 1995). Возможные усовершенствования, позволяющие увеличить частоту гомологичной рекомбинации, могли бы заключаться в использовании более протяженной области гомологии, в применении более эффективных негативных селективных маркерных генов или в индукции двунитевых разрывов (double strand breaks - DSBs) в локусе-мишени. Недавно показано увеличение частоты гомологичной рекомбинации в специфических локусах индукцией DSB с использованием эндонуклеаз (Puchta et al., 1996). Природный локус TGA3 арабидопсиса был маркирован с помощью агробактериальной трансформации вектором, содержащим область гомологии длиной 7 т.п.о. за счет того, что селективный маркерный ген был фланкирован двумя фрагментами генома, вырезанными из интересующего локуса (Miao et al., 1995). Из 2580 трансформированных каллусов была изолирована только одна маркированная линия, из которой не удалось получить растения-регенеранты. В то же время, следует отметить, что направленный инсерционный мутагенез у растений - это пока еще недостаточно хорошо разработанный метод.

Показано, что для растений применима сайт-специфическая рекомбинационная система бактериофага P1 с сайтом loxP-Cre, что позволяет использовать эту систему в агробактериальной трансформации для прямой сайт-специфической интеграции и регуляции экспрессии гена (Odell et al., 1990, 1994). Сайт-специфическая рекомбинационная система может быть использована для удаления селективных маркерных генов из генома растения и для группировки трансгенов. Кроме того, сайт-специфическое размещение рекомбинационных сайтов в геноме может привести к крупным перестройкам хромосом (Ow et al., 1995).

VII. Применение агробактериальной трансформации для получения генно-инженерных растений с новыми признаками

Генная инженерия растений с использованием агробактериальной трансформации может помочь селекционерам создать линии со специфически модифицированными основными генами или сконструировать генотипы с новыми генами, что будет способствовать получению растений, устойчивых к гербицидам, болезням или к стрессовым условиям среды; с улучшенной способностью к размножению гибридов, архитектоникой растения, и фотосинтетической эффективностью, способные к синтезу лекарственных соединений, с улучшенными производственными характеристиками, такими, как качество семян и плодов; повышенным качеством специфических масел, крахмала и белков, продукции белков, применяемых в медицине; новых химических соединений и т.д. В генной инженерии растений предпочтительно используют агробактериальную трансформацию, сокращающую время для поиска трансгенных растений с адекватной инсерцией трансгена. Ниже дан краткий обзор основных генных конструкций, используемых в генной инженерии, основанной на агробактериальной трансформации.

Получены трансгенные растения, устойчивые к различным неселективным гербицидам, таким, как фосфинотрицин (De Block et al., 1987), глифосат (Shah et al., 1986), сульфонилуры и имидазолины (Haughn et al., 1988). Полученная устойчивость к гербицидам может быть использована не только для контроля количества сорняков, но также для скрининга потомства трансгенных линий при размножении растений. Поиск агрономически полезных фенотипов при размножении может быть облегчен сцеплением гена устойчивости к гербицидам с другими генами, контролирующими хозяйственно ценные признаки, которые иначе нельзя отселектировать, как, например, в случае генов мужской стерильности, сцепленных с геном *bar*, контролирующим устойчивость к гербициду (Mariani et al., 1990). Так как селекционеры и фермеры имеют в арсенале мало средств для борьбы с вирусами, используются другие подходы, в частности, создание генно-инженерных растений, устойчивых к вирусам, за счет того, что они содержат гены, кодирующие вирусный капсид или белки оболочки вирусов (Abel et al., 1986; Loesch-Fries et al., 1988), а в случае некоторых РНК-содержащих вирусов - кДНК копии сателлитной РНК (Harrison et al., 1987; Gerlach et al., 1987) или экспрессирующие антисмысловые РНК (Cuozzo et al., 1988).

Устойчивость к насекомым также является важным аспектом генной инженерии. Использование мало токсичных агрохимикатов становится все более важным в контроле численности насекомых с целью снижения риска для здоровья людей и загрязнения окружающей среды. Успех в получении устойчивых к насекомым трансгенных растений достигнут при агробактериальной трансформации конструкциями, несущими встроенные гены, кодирующие инсектицидный кристаллический белок (insecticidal crystal proteins - ICPs) (Vaецk et al., 1987; Fischhoff et al., 1987) или ген ингибитора протеиназ (Hilder et al., 1987).

Создание генно-инженерных растений, устойчивых к грибным заболеваниям, также заслуживает внимания. Трансгенные проростки табака и рапса, экспрессирующие ген фасоли, контролирующий синтез хитиназы под контролем конститутивного промотора CaMV35S, проявили увеличенную жизнеспособность при выращивании в почве, инфицированной патогенным грибом *Rhizoctonia*, и характеризовались поздним развитием симптомов болезни (Broglie et al., 1991). Другой подход для создания генно-инженерных растений, устойчивых к грибным заболеваниям - это внедрение и экспрессия бактериального гена рибонуклеазы под контролем промотора, который отвечает исключительно на атаку патогена (Strittmatter et al., 1995).

Стрессовые условия среды являются одним из главных факторов, лимитирующих урожай. Генетические манипуляции уровнем экспрессии ферментов, вовлеченных в утилизацию активных форм кислорода, привели к пониманию роли этих ферментов в защите от окислительного стресса, а также необходимости получения трансгенных растений, устойчивых к этому стрессу (Allen, 1995).

Селекция гибридов возможна только для тех растений, у которых получены линии с мужской стерильностью, но с возможностью восстановления фертильности, или формы, для которых механическое удаление пыльников экономически выгодно. Получение трансгенных растений с ядерной мужской стерильностью может значительно облегчить селекцию гибридов и расширить круг видов, вовлеченных в гибридизацию. Интродукция гена, контролирующего синтез цитотоксической рибонуклеазы (barnase) под контролем тапетум-специфического промотора, позволяет получать растения с мужской стерильностью, так как у трансгенных растений клетки тапетума разрушаются (Mariani et al., 1990). Фертильность таких генно-инженерных растений может быть восстановлена при интродукции химерного гена, контролирующего синтез ингибитора РНК-азы, под контролем того же специфичного для пыльников промотора рТА29 (Mariani et al., 1992).

Получение трансгенных растений с измененной архитектурой позволяет улучшить их продуктивность. Архитектура растений в условиях поля главным образом зависит от способности отвечать на свет, поэтому использование методов генной инженерии для изменения гена, относящегося к семейству фитохромов (PHY), открывает возможности для регулирования урожая. В условиях высокой загущенности, для того, чтобы избежать затенения, растения сильно удлиняются, что происходит в ущерб росту листьев, продукции запасющих органов и репродуктивного развития. В полевых условиях у растений табака, характеризующихся сверхэкспрессией гена PHYA, синдром «избегания тени» был подавлен, что приводило к накоплению фототрассимилатов в листьях и увеличению урожая (Robson et al., 1996).

Rol-гены *A. rhizogenes* могут быть использованы для регуляции таких процессов, как формирование адвентивных корней, стимуляция боковых почек, индукция цветения, развитие цветка и фертильность. Однако главным недостатком трансгенных растений с *rol*-генами является наличие плейотропного эффекта. Этот эффект может быть подавлен, если использовать органо- или тканеспецифичные промоторы. Применение генов *rol* для улучшения качества растений было продемонстрировано на розах, которые состояли из нетрансформированного побега, привитого на укорененный подвой, трансформированный генами *rol*. Из нетрансформированного побега массово формировались боковые побеги, однако других эффектов *rol*-генов не обнаружено (van der Salm, 1996).

Загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами представляет серьезную опасность для здоровья людей. Поскольку металлы не могут быть деградированы химическим путем, безопасных и дешевых способов уменьшения токсического загрязнения в настоящее время не существует. Путем трансформации агробактериями получены трансгенные растения арабидопсиса, содержащие ген, контролирующий синтез ртути-ион-редуктазы, которая превращала токсичные ионные формы ртути в менее токсичные пареообразные формы. Эти эксперименты показывают возможность утилизации загрязнений ионами тяжелых металлов с помощью трансгенных растений (Rugh et al., 1996).

С помощью методов генной инженерии были получены растения с улучшенными промышленными характеристиками. Примерами этому служат: 1) трансгенные растения томатов с продленным сроком годности плодов, содержащие ген, экспрессия которого приводит к уменьшению уровня эндогенного этилена (Hamilton et al., 1990; Oeller et al., 1991), или 2) содержащие ген, контролирующий синтез полигалактуроназы, фермента, участвующего в разрушении клеточной стенки (Gray et al., 1994), 3) трансгенные растения масличных культур, у которых изменена экспрессия стеароил-АЦП-десатуразы и увеличен уровень ненасыщенных жирных кислот в семенах (Kridl et al., 1991), 4) трансгенные растения с увеличенным уровнем крахмала, экспрессирующие мутантный ген АДП-глюкозы, выделенный из *E.coli* (Stark et al., 1991), 5) трансгенные растения с высокой питательной ценностью, содержащие химерный ген, выделенный из бразильского ореха, кодирующий белок, обогащенный метионином и экспрессирующийся в семенах (Altenbach et al., 1989), 6) трансгенные растения арабидопсиса, продуцирующие новые биополимеры растений, такие как полигидроксibuтират – биodeградируемый термопластик (Poirier et al., 1992), 7) трансгенные растения как новый источник различных вакцин, применяемых для сохранения здоровья людей (Hag et al., 1995), и рекомбинантных антител (Fiedler, Conrad, 1995).

В течение последнего десятилетия передача в различные виды растений генов с помощью агробактериальной трансформации привела к получению генно-инженерных сельскохозяйственных культур с новыми признаками, а также новых форм растений, используемых для изучения структуры и функции гена. Дальнейшая идентификация, маркирование и выделение генов, которые контролируют морфологические, биохимические параметры развития растений, сопровождаемые увеличением частоты гомологичной рекомбинации между трансгеном и генами растения-хозяина, приведут к более «направленному» улучшению растений по агрономическим и промышленным признакам.

VIII. Литература

- Abel P., Nelson R., De B., Hoffman N., Rogers S., Fraley R., Beachy R. (1986) Science. V. 232, p. 738-743.
 Alien R. (1995) Plant Physiol. V. 107, p. 1049-1054.
 Altenbach S., Pearson K., Mecker G., Staraci L., Sun S. (1989) Plant Molec. Biol. V. 13, p. 513-522.
 Bechtold N., Ellis J., Pelletier G. (1993) C.R. Acad. Sci. V. 316, p. 1194-1199.
 Bensen R., Johal G., Crane V., Tossberg J., Schnable P., Meely R., Briggs S. (1995) The Plant Cell. V. 7, p. 75-84.
 Broglie K., Chet I., Holliday M., Cressman R., Biddle P., Knowlton S., Mauvais C., Broglie R. (1991) Science. V. 254, p. 1194-1197.
 Chilton M.D. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 90, p. 3119-3120.
 Cuozzo M., O'Connell K., Kaniewski W., Fang R., Chua N., Turner N. (1988) Bio/Technol. V. 6, p. 549-557.
 Deblaere R., Bytebier B., De Greve H., Deboeck F., Van Montagu M., Schell J., Leemans J. (1985) Nucleic Acids Res. V. 13, p. 4777-4788.

- De Block M., Botterman J., Vandewiele M., Dockx J., Thoens C., Gossele V., Movva N., Thompson C., Van Montagu M., Leemans J. (1987) *EMBO J.* V. 6, p. 2513-2518.
- Feldmann K., Malmberg R.L., Dean C. (1994) In: *Arabidopsis*. Meyerowitz E.M., Somerville C.R. (eds) pp. 137-172, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Fiedler U., Conrad U. (1995) *Bio/Technology*. V. 13, p. 1090-1093.
- Fischhoff D., Bowditch K., Perlak F., Manone P., McCormick S., Niedermeyer J., Fean D., Kusano-Kretzmer K., Mayer E., Rochester D., Rogers S., Fraley T. (1987) *Bio/Technology*. V. 5, p. 807-813.
- Fritze K., Czaja J., Walden R. (1995) *Plant J.* V. 7, p. 261-272.
- Gerlach W., Llewellyn D., Haseloff J. (1987) *Nature*. V. 328, p. 802-805.
- Goddijn O., Lindsey K., van der Lee F., Klap J., Sijmons P. (1993) *Plant J.* V. 4, p. 863-873.
- Gray J., Picton S., Giovannoni J., Grierson D. (1994) *Plant Cell Environ.* V. 17, p. 557-571.
- Halfter U., Morris P., Willmitzer L. (1992) *Mol. Gen. Genet.* V. 231, p. 186-193.
- Hamilton A., Lycett G., Grierson D. (1990) *Nature*. V. 346, p. 284-287.
- Hamilton C., Frary A., Lewis C., Tanksley S. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 93, p. 9975-9979.
- Harrison B., Mayo M., Baulcombe D. (1987) *Nature*. V. 328, p. 799-802.
- Haughn G., Smith J., Mazur B., Somerville C. (1988) *Mol. Gen. Genet.* V. 211, p. 266-271.
- Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. (1994) *Plant J.* V. 6, p. 271-282.
- Hiilder V., Gatehouse A., Sheerman S., Barker R., Boulter D. (1987) *Nature*. V. 330, p. 160-163.
- Hoekema A., Hirsch P., Hooykaas P.J.J., Schilperoort R.A. (1983) *Nature*. V. 303, p. 179-180.
- Horsch R., Fry J., Hoffman N., Eichholtz D., Rogers S., Fraley R. (1985) *Science*. V. 227, p. 1229-1231.
- Ishida Y., Saito H., Ohta S., Hiei Y., Komari T., Kumashiro T. (1996) *Nature Biotechnology*. V. 14, p. 745-750.
- Jones J., Duinsmuir P., Bedbrook J. (1985) *EMBO J.* V. 4, p. 2411-2418.
- Kertbundit S., De Greve F., Deboeck M., Van Montagu M., Hernalsteens J.P. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 88, p. 5212-5216.
- Komari T. (1990) *Plant Cell Rep.* V. 9, p. 303-306.
- Komari T., Halperin W., Nester E. (1986) *J. Bacteriol.* V. 166, p. 88-94.
- Komari T., Hiei Y., Saito Y., Murai N., Kumashiro T. (1996) *Plant J.* V. 10, p. 165-174.
- Koncz C., Martini N., Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Korber H., Redei G., Schell J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 86, p. 8467-8471.
- Koncz C., Nemeth K., Redei G., Schell J. (1992) *Plant Mol. Biol.* V. 20, p. 963-976.
- Kridl J., Knutson D., Johnson W., Thompson G., Radke S., Turner J., Knauf V. (1991) *Molecular Biology of Plant Growth and Development*, Tucson, p. 723.
- Lee K., Lund P., Lowe K., Dunsmuir P. (1990) *Plant Cell*. V. 2, p. 415-425.
- Lindsey K., Wei W., Clarke M., McArdle H., Rooke L., Topping J. (1993) *Transgenic Res.* V. 2, p. 33-47.
- Loesch-Fries L., Merlo D., Zinnen T., Burhop L., Hill K., Krahn K., Jarvia N., Nelson S., Halk E. (1988) *EMBO J.* V. 6, p. 1845-1851.
- Mandal A., Lang V., Orczyk W., Palva E.T. (1993) *Theor. Appl. Genet.* V. 86, p. 621-628.
- Mariani C., De Beuckeleer M., Truettner J., Leemans J., Goldberg R. (1990) *Nature*. V. 347, p. 737-741.
- Mariani C., Gossele V., De Beuckeleer M., De Block M., Goldberg R., De Greef W., Leemans J. (1992) *Nature*. V. 357, p. 384-387.
- Miao Z.H., Lam E. (1995) *Plant J.* V. 7, p. 359-365.
- Morton R., Hooykaas P. (1995) *Mol. Breed.* V. 1, p. 123-132.
- Odell J., Caimi P., Sauer B., Russell S. (1990) *Mol. Gen. Genet.* V. 223, p. 369-378.
- Odell J., Hoopes J., Vermerris W. (1994) *Plant Physiol.* V. 106, p. 447-458.
- Oeller P., Min-Wong L., Taylor L., Pike D., Theologis A. (1991) *Science*. V. 254, p. 437-439.
- Offringa R., Franke-van Dijk M., De Groot M., van den Elzen P., Hooykaas P. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 90, p. 7346-7350.
- Ow D., Medberry S. (1995) *Crit. Rev. Plant Sci.* V. 14, p. 239-261.
- Poirier Y., Dennis D., Klomparens K., Somerville C. (1992) *Science*. V. 256, p. 520-523.
- Puchta H., Dujon B., Hohn B. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 93, p. 5055-5060.
- Register J., Peterson D., Bell P., Bullock W., Evans I., Frame B., Greenland A., Higgs N., Jepson I., Jiao S., Lewnau C., Sillick J., Wilson H. (1994) *Plant Mol. Biol.* V. 25, p. 951-961.
- Robson P., McCormac A., Irvine A., Smith H. (1996) *Nature Biotechnol.* V. 14, p. 995-998.
- Rugh C., Wilde H., Stack N., Thompson D., Summers A., Mcagher R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 93, p. 3182-3187.
- Saito Y., Komari T., Masuta C., Hayashi Y., Kumashiro T., Takanami Y. (1992) *Theor. Appl. Genet.* V. 83, p. 679-683.
- Shah D., Horsch R., Klee H., Kishore G., Winter I., Turner N., Hironaka C., Sanders P., Gasser C., Aykent S., Siegel N., Rogers S., Fraley R. (1986) *Science*. V. 233, p. 476-481.
- Stark D., Barry G., Muskopf Y., Timmerman K., Kishore G. (1991) *Molecular Biology of Plant Growth and Development*, Tucson, p. 714.
- Strittmatter G., Janssens J., Opsomer C., Botterman J. (1995) *Bio/Technology*. V. 13, p. 1085-1089.
- Vaeck M., Reynaerts A., Hofte H., Janssens S., De Beuckeleer M., Dean C., Zabau M., Van Montagu M., Leemans J. (1987) *Nature*. V. 328, p. 33-37.

- van der Salm T., Hanisch ten Cate C., Dons H. (1996) *Plant Mol. Biol. Rep.* V. 14, p. 207-228.
- Walden R., Fritze K., Hayashi H., Miklashevichs E., Harling H., Schell J. (1994) *Plant Mol. Biol.* V. 26, p. 1521-1528.
- Walters D., Vetsch C., Potts D., Lundquist R. (1992) *Plant. Mol. Biol.* V. 18, p. 189-200.
- Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., Van Montagu M., Schell J. (1983) *EMBO J.* V. 4, p. 277-284.
- Zambryski P. (1992) *Annu. Rev. Plant Physiol.* V. 43, p. 465-490.

Разнообразие процессов образования корневых клубеньков и их инфицирования ризобиями

Хадри А.-Е., Спайнк Г., Бисселинг Т., Бревин Н.

I.	Хозяйская специфичность ризобий.....	373
II.	Эволюционное разнообразие процессов образования клубеньков.....	374
III.	Сравнительная анатомия корневого клубенька.....	375
	III.A. Симбиоз растений с ризобиями.....	375
	III.A.1. Формирование корневых клубеньков и инфицирование в бобово-ризобальном симбиозе.....	376
	III.A.2. Тканевая организация детерминированных и недетерминированных клубеньков.....	379
	III.A.3. Другие способы инфицирования тканей и клеток при бобово-ризобальном симбиозе.....	380
	III.A.4. Обобщения.....	382
	III.A.5. Симбиоз ризобий с небобовыми.....	382
	III.B. Симбиоз растений с актиномицетами.....	382
	III.B.1. Тканевая организация симбиоза.....	384
IV.	Регуляция образования клубеньков растением.....	385
V.	Благодарности.....	386
VI.	Литература.....	386

I. Хозяйская специфичность ризобий

Присутствие клубеньков на корнях растений семейства Leguminosae привлекало внимание ученых уже в средние века. Иллюстрацией этого является описание корневых клубеньков Далекампом (Dalechamps) в его работе *Historia Generalis Plantarum*, опубликованной в двух томах в 1586-1587 годах (рис. 1). До сих пор известен лишь один исключительный случай формирования ризобиями азотфиксирующего симбиоза вне семейства бобовых: у некоторых видов *Parasponia* – рода сем. Ulmaceae описана способность к взаимодействию с *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* (Trinick, 1979; Becking, 1992). Несмотря на то, что микробно-растительные взаимодействия интенсивно изучаются уже несколько десятилетий, до сих пор неясно, какие особенности бобовых обеспечивают их способность к симбиозу с ризобиями, а также какие особенности *Parasponia* позволяют этому растению, подобно бобовым, вступать в симбиоз (Marvel et al., 1987).

В отличие от своих хозяев, ризобии представляют собой очень разнородную группу грам-отрицательных бактерий, включающих роды *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* и *Mesorhizobium* (Young, Naukka, 1996; глава 1). В зависимости от специфичности по отношению микросимбионтам, в семействе бобовых выделяют различные группы растений-хозяев. На основе этого критерия был предложен термин “группа перекрестной инокуляции”, определяемый классом штаммов ризобий, нодулирующих данную группу растений. В самом первом приближении можно выделить две группы бобовых растений – широкоспецифичные и узкоспецифичные хозяева (табл. 1 и 2). Хотя многие виды ризобий до сих пор детально не изучены по своей хозяйской специфичности, можно видеть (табл. 2), что некоторые бактерии очень специфичны, вступая в

Таблица 1. Примеры хозяйской специфичности ризобий

Названия видов бактерий, использовавшиеся ранее: (1) *Rhizobium leguminosarum*, (2) *R. trifolii*, (3) *R. meliloti*, (4) *R. phaseoli* или *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* тип 1, (5) *R. loti*, (6) *R. fredii*, (7) *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*, тип 2.

Виды бактерий	Растения-хозяева
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
biovar <i>viceae</i> (1)	<i>Pisum, Vicia, Lathyrus, Lens</i>
biovar <i>trifolii</i> (2)	<i>Trifolium</i>
biovar <i>phaseoli</i> (3)	<i>Phaseolus</i>
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>Rhizobium etli</i> (4)	<i>Phaseolus</i>
<i>Mesorhizobium loti</i> (5)	<i>Lotus, Anthyllus, Lupinus</i>
<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Galega</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i> (6)	<i>Glycine, Vigna</i>
<i>Rhizobium tropici</i> (7)	<i>Leucaena, Phaseolus, Medicago, Macroptilium</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine, Macroptilium, Vigna</i>
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Glycine, Macroptilium, Vigna</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Rhizobium</i> spp.	
BR816	<i>Leucaena, Phaseolus, Parasponia</i>
NGR234, MPIK1030	Широкий круг хозяев, включая небобовое <i>Parasponia</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i> USDA257	Широкий круг хозяев

симбиоз лишь с определенными сортами растений. Наиболее изученным примером такого рода является взаимодействие афганского гороха со штаммом ТОМ *R. leguminosarum* bv. *viceae*, который представляет пример высокоспецифичного взаимодействия, основанного на системе "ген-на-ген". Как видно из таблицы 1, корреляция между степенью специализации у бактерий и растений отсутствует. Например, виды *Phaseolus* могут вступать в симбиоз с бактериями разных видов, включая широко- и узко-специфичные штаммы. Основными детерминантами хозяйской специфичности ризобий являются сигнальные молекулы, называемые Nod-факторами (глава 21), которые определяют взаимодействие бактерий с растениями определенной группы перекрестной инокуляции. Сравнение Nod-факторов разных видов ризобий показало, что действительно существует связь между их хозяйской специфичностью и структурой этих сигналов (Denarie et al., 1996).

II . Эволюционное разнообразие процессов клубенькообразования

Многие растения образуют азотфиксирующие клубеньки с актиномицетами рода *Frankia* (Pawlowski, Bisseling, 1996). Известные хозяева *Frankia* включают свыше 200 видов из 24 родов, относящихся к 8 семействам деревянистых двудольных растений (Baker, Mullin, 1992). В то время как клубеньки бобовых имеют периферическую проводящую систему, актиноризные клубеньки представляют собой модифицированные боковые корни с центральной проводящей системой. Однако, другие черты заселения тканей и клеток микроорганизмами для актиноризы и бобовых сходны. Инфицирование растений как *Frankia*, так и ризобиями может происходить либо через корневые волоски, либо через межклеточные пространства (Callaham, Torrey, 1977; Miller, Baker, 1986). Проникающие в корень гифы актиномицета всегда наполнены матриксом из зооглеи, содержащим полисахариды и гликопротеиды растительного происхождения (Liu, Berry, 1991), при этом наблюдается активная экспрессия генов растительного гемоглобина (Appleby, 1992; Jacobsen-

Таблица 2. Примеры трех типов хозяйской специфичности

(1) *Trifolium subterraneum*, сорт Woogenellup, (2) *Bradyrhizobium japonicum* штамм USDA61 и штаммы, принадлежащие к серотипу USDA123 не образуют клубеньков на этом растении, а другие штаммы - образуют

Специфичность	Хозяева	Штаммы бактерий	Ссылки
Сортовая	Афганские горохи	<i>R. l. bv. viceae</i> TOM	Lie, 1978; Kozik et al., 1995
	Клевер Woogenellup (1)	<i>R. l. bv. trifolii</i> TA1	Lewis-Henderson, Djordjevic, 1991
	Соя Rj4	USDA61 (2)	Vest, Caldwell, 1972; Sadowsky, Cregan, 1992
Узкая видовая	<i>Trifolium</i> spp.	<i>R. l. bv. trifolii</i>	
Широкая видовая	> 50 родов	NGR234	Lewin et al., 1987
	> 26 родов	<i>S. fredii</i>	Pueppke, Broughton, 1996

Lyon et al., 1995). Недавно выяснилось, что актиноризные растения и бобовые входят в состав одной и той же филогенетической группы - клада Розид-1 (Soltis et al., 1995), в котором очевидно имелась предрасположенность к образованию симбиоза в форме корневых клубеньков. По-видимому, в филогенезе этого клада имело место несколько независимых актов эволюционного возникновения азотфиксирующих симбиозов с актиномицетами и ризобиями (Doyle, 1994; Swensen, 1996). Поскольку семейство Ulmaceae, к которому относится *Parasponia*, входит в этот же клад, можно предположить, что в ходе эволюции симбиоза с ризобиями растения *Parasponia* "использовали" структурные элементы клубеньков, которые у других небобовых функционируют в актиноризном симбиозе (Lancelle, Torrey, 1984). Таким образом, модификация морфологии боковых корней и индукция гемоглобина — это свойства, которые можно было ожидать у растений *Parasponia*, если бы они взаимодействовали с актиномицетами, а не с ризобиями. В эволюционном контексте важно отметить, что Leguminosae (Fabaceae) представляет собой очень большое и разнородное семейство двудольных, включающее около 20000 видов (Allen, Allen, 1981). Два его подсемейства состоят преимущественно из деревьев и кустарников: Caesalpinioideae, включающее 180 родов и 2800 видов и Mimosoideae с 65 родами и 2900 видами. Третье, наиболее крупное подсемейство, Papilionoideae, включает свыше 500 родов и 14500 видов, как деревянистых, так и травянистых, в том числе все основные зерновые и кормовые сельскохозяйственные бобовые культуры. Гипотетический общий предок бобовых существовал около 70 млн. лет назад, и согласно палеонтологическим данным, дивергенция основных подсемейств бобовых произошла около 50 млн. лет назад (Sprent, Raven, 1992; глава 25). Современные представители всех трех подсемейств образуют азотфиксирующие клубеньки с *Rhizobium*, *Azorhizobium* и *Bradyrhizobium*, что говорит о древности этого свойства в эволюции бобовых. Однако только в некоторых родах цезальпиниевых было выявлено клубенькообразование (Sprent, 2001), тогда как в других подсемействах этим признаком обладает около 90% растений (de Faria et al., 1989). В настоящее время считается, что симбиоз с ризобиями возникал у бобовых несколько раз (Young, Johnston, 1989; Doyle, 1994; Soltis et al., 1995).

III. Сравнительная анатомия корневого клубенька

III.A. СИМБИОЗ РАСТЕНИЙ С РИЗОБИЯМИ

Принимая во внимание эволюционное разнообразие бобово-ризобиального симбиоза и малое количество детально изученных видов растений, представляется затруднительным делать обобщения о структурных основах установления симбиотической системы. В таблице 3 суммированы данные о разнообразии механизмов инвазии тканей и клеток у некоторых хорошо изученных бобовых (как травянистых, так и деревянистых), а также у небобового *Parasponia*. Хозяева, перечис-

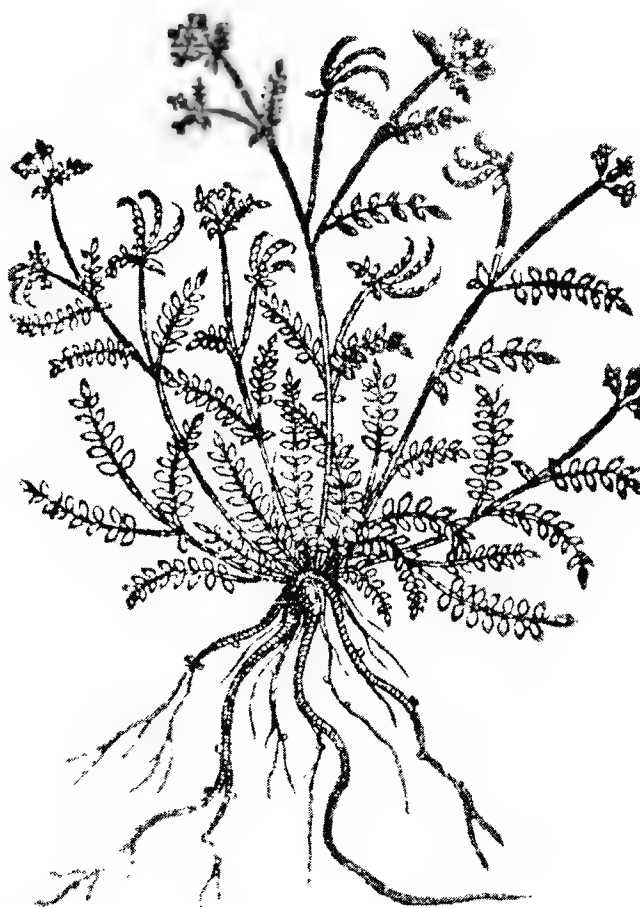


Рисунок 1. Растение *Ornithopodium tuberosum* Dalech. с корневыми клубеньками (из: Dalechamps, 1586).

ленные в этой таблице, были выбраны потому, что они представляют характерные особенности онтогенеза симбиотической системы. Однако необходимо отметить, что даже у одного и того же растения можно наблюдать разные пути инвазии. Поскольку в ряде работ было изучено инфицирование разных хозяев одним и тем же штаммом ризобий, понятно, что морфогенез клубеньков практически полностью детерминируется растением (Кіпне, 1992).

В дальнейшем мы будем описывать формирование корневых клубеньков и организацию клубеньковых тканей у наиболее изученных бобовых (горох, люцерна, соя и клевер). Затем мы обратимся к различиям в уровне тканевой и клеточной инвазии у бобовых и небобового *Parasponia*. И наконец, мы рассмотрим актиноризный симбиоз и сравним его с клубеньками бобовых.

III.A.1. Формирование корневых клубеньков и инфицирование в бобово-ризобияльном симбиозе

Внешний вид и развитие клубеньков очень разнообразны (рис. 2). Различают два основных типа клубеньков: недетерминированные, содержащие постоянную меристему, которая определяет их цилиндрическую форму (рис. 2C), и детерминированные, не имеющие постоянной меристемы и потому сохраняющие сферическую форму (рис. 2D). Кроме того, иногда клубеньки располагаются на стеблях, что характерно для некоторых тропических бобовых, например, *Sesbania rostrata*

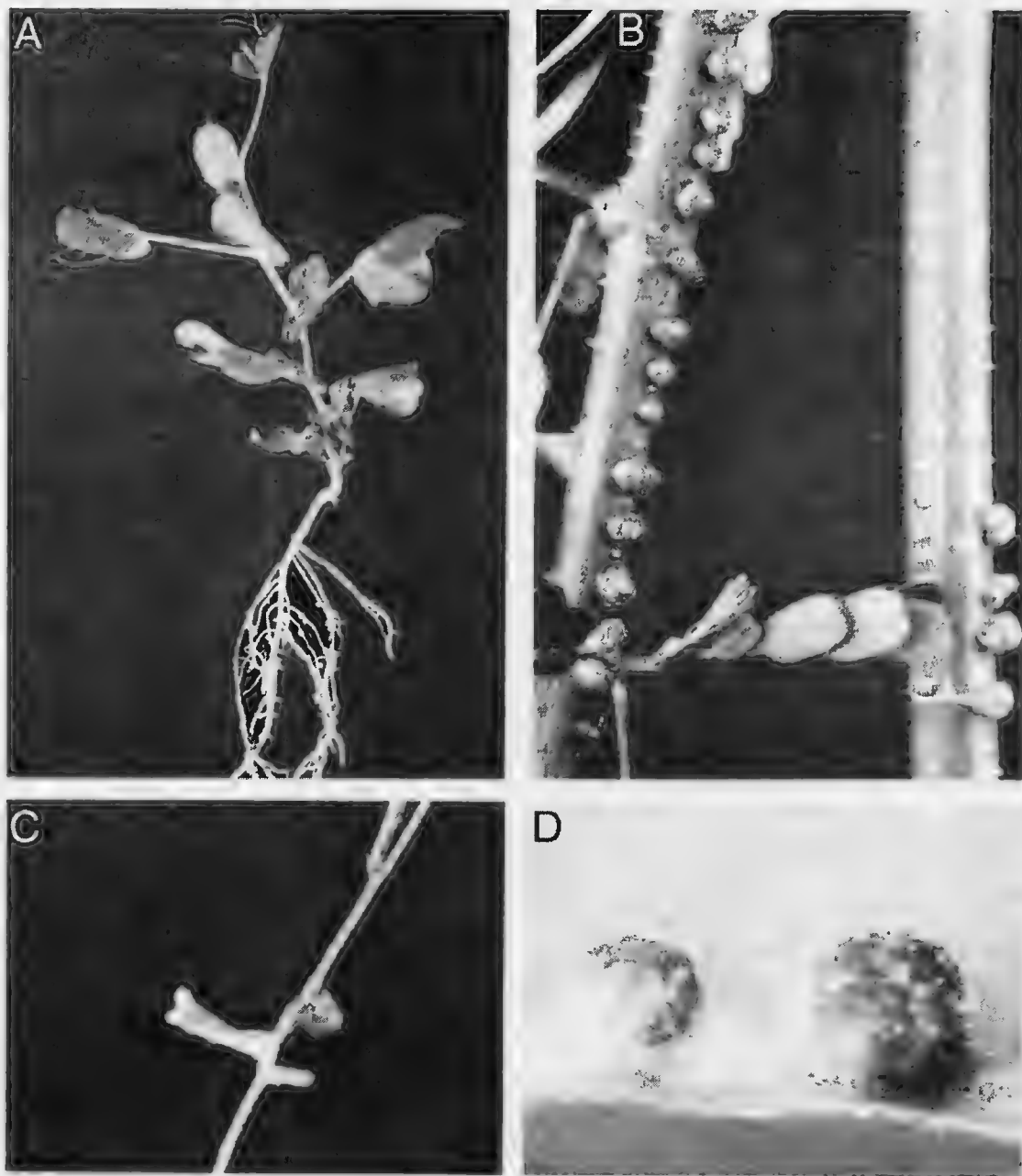


Рисунок 2. Различные типы клубеньков, образуемых ризобиями у бобовых растений. А — недетерминированные клубеньки на корнях гороха (*Pisum sativum*). В — детерминированные клубеньки на стебле *Sesbania rostrata* (образуются из примордиев адвентивных корней). Фотографию предоставила Dr. M. Holsters. С — недетерминированные клубеньки на корнях *Vicia hirsuta*. D — детерминированные клубеньки на корнях *Lotus preslii*.

Таблица 3. Инвазия ризобиями клеток и тканей различных хозяев

Корневой эпидермис: 1 — скручивание и деформация корневых волосков, 2 — инфекционные нити в корневых волосках, 3 — проникновение через разрывы эпидермиса.

Кортекс корня: 4 — пролиферация кортикальных клеток, 5 — распространение из клетки в клетку посредством инфекционных нитей, 6 — колонизация межклеточных пространств, 7 — колонизация митотических клеток.

Развитие клубенька: 8 — периферическая проводящая ткань, 9 — центральная проводящая ткань, 10 — клубеньки в сайтах появления латеральных корней.

Симбиотическая азотфиксация: 11 — образование гемоглобина, 12 — азотфиксирующие бактериоиды в симбиосомах, 13 — азотфиксирующие бактериоиды в фиксационных нитях.

Хозяева	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	ссылки
<i>Pisum sativum</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	Kijne, 1992
<i>Glycine max</i>	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	Turgeon, Bauer, 1985
<i>Arachis hypogaea</i>	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	Chandler, 1978
<i>Stylosanthes</i> spp.	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	Chandler, 1982
<i>Neptunia natans</i>	-	-	+	+	-/+	+	+	+	-	+	+	+	-	Subba-Rao et al., 1995
<i>Andira</i> spp.	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	de Faria et al., 1987
Небобовое <i>Parasponia</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	Lancelle, Torrey, 1984

(рис. 2В). Несмотря на столь большие различия, процессы образования корневых и стеблевых клубеньков объединяет локализация их примордиев напротив полюсов протоксилемы (рис. 3).

При развитии клубеньков параллельно происходят два процесса: инфицирование и органогенез. При инфицировании корня ризобии сначала прикрепляются к корневым волоскам, вызывают их деформацию, скручивание и формирование инфекционной нити (Turgeon, Bauer, 1995; Kijne et al., 1992). Параллельно инфицированию кортикальные клетки дедифференцируются и начинают делиться. Это приводит к формированию клубенькового примордия, из которого развивается клубенек. Уже на ранних стадиях симбиоза клубеньковые примордии можно отличить от примордиев боковых корней, которые возникают в перикле (рис. 4А).

Симбиоз *R. leguminosarum* bv. *viciae* с горохом (*Pisum sativum*) (табл. 3, рис. 2А), является одним из наиболее изученных и представляет последовательность процессов развития, которую считают типичной для многих бобово-ризобияльных систем (например, с участием *Medicago*, *Trifolium* и *Vicia*). Механизм инфекции представлен на рис. 5 и широко описан в литературе (Newcomb, 1976; Brewin, 1991; Kijne, 1992). Инфекционная нить, заполненная делящимися бактериями, прорастает через корневые волоски в направлении клубенькового примордия, локализованного во внутреннем кортексе (Bakhuizen, 1988) (рис. 4В). Ризобии, освобождаясь в цитоплазму растительных клеток, окружаются мембранами растительного происхождения, которые называют перибактероидными (Newcomb, 1976; Kijne, 1992). На этой стадии ризобии дифференцируются в эндосимбиотические формы, называемые бактериоидами, которые вместе с окружающей их перибактероидной мембраной составляют симбиосому (Roth, Stacey, 1989b; Kijne, 1992). После инфицирования примордии развиваются в азотфиксирующие клубеньки. В случае гороха клубеньки относят к недетерминированному типу, который характеризуется неинфицированной апикальной меристемой. В процессе развития ризобии проходят через серию специализированных экологических ниш и их физическое взаимодействие с растительными клетками становится все более тесным (рис. 5, а-е).

Иные механизмы инфицирования действуют при образовании детерминированных клубеньков у таких бобовых как соя (*Glycine max*), фасоль (*Phaseolus vulgaris*) и *Vigna* spp. (Turgeon, Bauer,

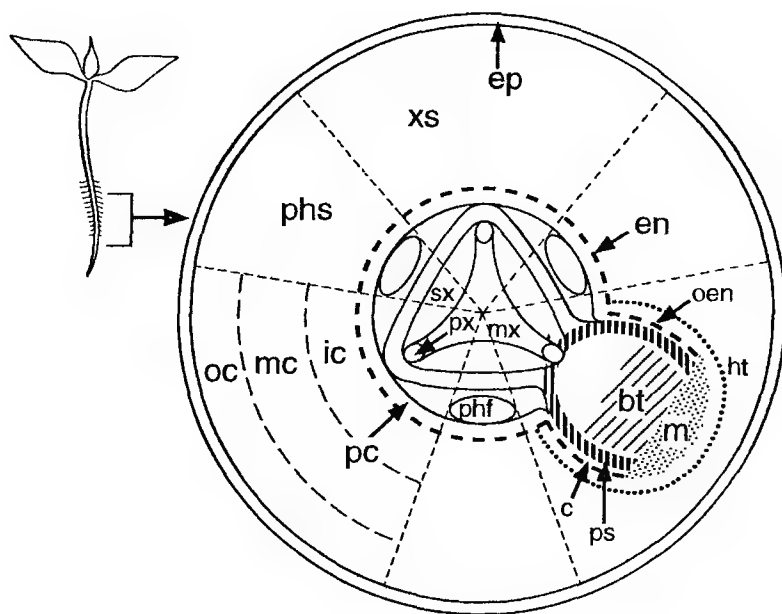


Рисунок 3. Топология процессов образования корневых клубеньков. Клубеньки индуцируются в зоне образования корневых волосков. Схема составлена на примере гороха, для которого характерна радиальная локализация процессов клубенькообразования. Общим для всех типов корневых и стеблевых клубеньков является их формирование напротив полюсов ксилемы, что обеспечивает связь проводящих систем клубеньков и корня.

ep — эпидермис, ic — внутренний кортекс, mc — средний кортекс, oc — наружный кортекс, phs — сектор флоэмы, xs — сектор ксилемы, en — эндодерма, pc — перицикл, phf — пучки флоэмы, px — протоксилема, mx — метаксилема, sx — вторичная ксилема, са — камбий, bt — бактериоидная ткань, с — кортекс клубенька, ht — ткань хозяина, m — апикальная меристема, oen — система наружной эндодермы, ps — проводящий пучок.

1985). У них инокуляция ризобиями индуцирует скручивание корневых волосков сразу после их появления и поэтому ризобии проникают в местах соединения клеток, а инфекционная нить начинает расти от основания корневого волоска. Другое различие состоит в том, что индуцируемые ризобиями деления клеток начинаются в наружном кортексе — гиподерме (рис. 4С) и в эти делящиеся клетки вскоре проникают инфекционные нити, которые освобождают бактерии (в составе симбиосом) в цитоплазму. В этом случае колонизация центральной части клубенька достигается путем деления ризобий и симбиосом в цитоплазме самих меристематических клеток. Затем меристема исчезает, что приводит к развитию сферических клубеньков детерминированного типа (Brewin et al., 1992).

III.A.2. Тканевая организация детерминированных и недетерминированных клубеньков

Детерминированные и недетерминированные клубеньки обладают сходной тканевой организацией (рис. 6, а-б), при которой центральная часть заселена бактериями и окружена несколькими слоями периферических тканей (Rolfe, Gresshoff, 1988; Brewin, 1991; Franssen et al., 1992). Периферические ткани включают клубеньковый кортекс, эндодерму и паренхиму, которая окружает проводящие пучки клубенька (Van de Wiel et al., 1990). Центральная часть состоит из двух типов клеток — инфицированных и неинфицированных. Инфицированные клетки заполнены бактериями и в них происходит азотфиксация. Несколько слоев неинфицированных клеток, называ-

емых промежуточными слоями, отделяют центральную часть от клубеньковой паренхимы (Gresshoff, Delves, 1986; Franssen et al., 1992). Меристема недетерминированных клубеньков не инфицирована и постоянно дифференцируется в различные ткани. Это приводит к тому, что ткани в центральной части клубенька образуют несколько зон, представляющих последовательные стадии развития симбиоза. Для дифференциации этих зон используют ультраструктурные характеристики растительных и бактериальных клеток, накопление крахмала и наличие азотфиксирующей активности (Vasse et al., 1990). Апикальную меристему обозначают как зону I. Ее образуют мелкие не вакуолизованные клетки, которые не содержат бактерий. Зона префиксации (II) следует непосредственно за меристемой. В дистальной части зоны префиксации инфекционные нити проникают в постмеристематические клетки и бактерии освобождаются в растительную цитоплазму, где начинается дифференцировка обоих симбионтов. В проксимальной части зоны преинфекции растительные клетки имеют удлинненную форму и симбиосомы пролиферируют. В зоне азотфиксации (III) растительные клетки достигают максимального размера. В интерзоне II-III, которая расположена между зонами фиксации и префиксации, в инфицированных клетках начинается накопление крахмала, а также появляются морфологически измененные бактерии (Vasse et al., 1990) и индуцируется экспрессия *nif*-генов (Yang et al., 1991). В более старых клубеньках присутствует зона старения (IV). Такое распределение по зонам применимо и для других типов недетерминированных клубеньков (Franssen et al., 1992). На различных стадиях развития клубенька индуцируется *de novo* или резко активируется экспрессия многих растительных генов, называемых нодулинами (Van Kammen, 1984). Эти гены разделяют на две группы, экспрессирующиеся на ранних стадиях развития (ENOD) или во время включения азотфиксации (NOD) (Nap, Bisseling, 1990).

III.A.3. Другие способы инфицирования тканей и клеток при бобово-ризобийном симбиозе

Arachis hypogaea отличается от других травянистых бобовых тем, что хотя корневые волоски и деформируются при инокуляции ризобиями (Chandler, 1978), колонизация бактериями клетки корневого волоска является abortивной. Проникновение через эпидермис происходит через межклеточные пространства ("разрывная инфекция"), например, проникновение в местах появления латеральных корней. Клеточные деления индуцируются в кортексе и его колонизация происходит через межклеточные пространства, путем проникновения через клеточные стенки. При этом инфекционные нити, распространяющиеся от клетки к клетке, отсутствуют, однако другие процессы развития клубеньков *Arachis* сходны с таковыми для *Glycine*. Клубеньки *Arachis* являются примером "аешеноменотидного типа", который характеризуется компактной структурой и полным отсутствием неинфицированных растительных клеток в центральной части (Sprent, Raven, 1992).

Ранние стадии инфекции у *Stylosanthes* и *Arachis* осуществляются сходным образом (Chandler et al., 1982). Скручивание корневых волосков при инокуляции ризобиями отсутствует, хотя слабое ветвление корневых волосков происходит, чаще всего вблизи боковых корней. Ризобии проникают в межклеточные пространства в местах появления боковых корней. Они инфицируют кортекс, вызывая изменения стенок кортикальных клеток, проникая в них и вызывая их коллапс. В итоге клеточная стенка разрушается многочисленными интрузиями и бактерии освобождаются в форме бактериоидов в делящиеся клетки внутреннего кортекса. Инфицированные растительные клетки формируют центральную часть клубенька. Эта форма становления эндосимбиоза включает коллапс и компрессию кортикальных клеток до установления мутуалистических отношений. Другой интересный пример проникновения ризобий через эпидермис дает *Mimosa scabrella*, у которой наблюдают растворение срединной пластинки между радиальными клеточными стенками (de Faria et al., 1988). Интересно, что при этом иногда формируются субэпидермальные клетки корневых волосков.

Neptunia natans — водное бобовое, лишенное корневых волосков (Subba-Rao et al., 1995). Проникновение бактерий наблюдается в местах появления боковых корней и цитологически показана межклеточная колонизация корневого кортекса, сопровождаемая внутриклеточным распространением ризобий в делящихся клетках клубенька. Другие водные бобовые, например, *Aeshynomene fluminensis* и *Sesbania rostrata* в ассоциации с *Azorhizobium* spp. развивают клубеньки на стеблях, а точнее, в основании растущих воздушных корней, формируемых на стеблях (рис. 2B). Стратегия

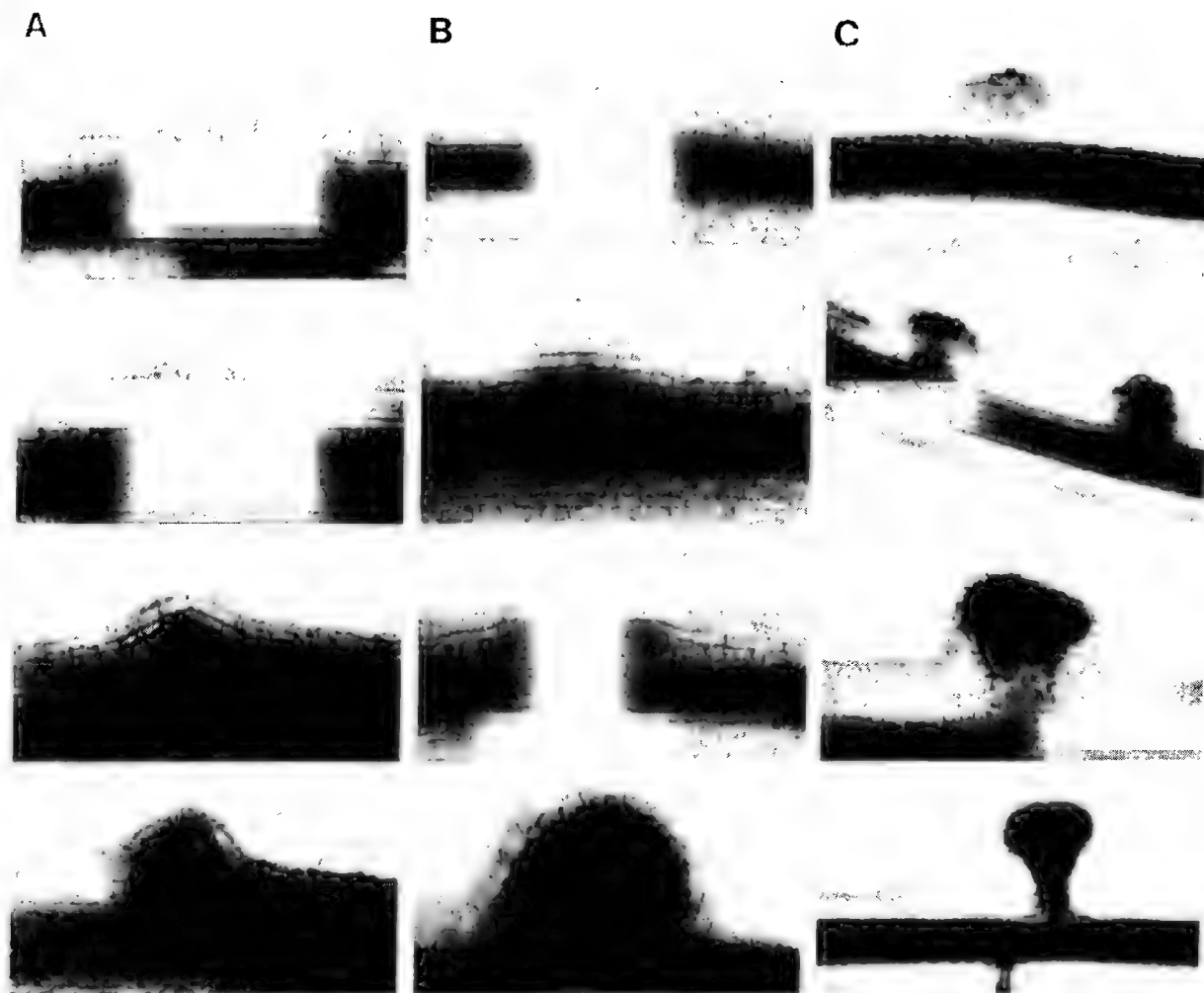


Рисунок 4. Последовательные стадии развития бокового корня (А), примордия корня во внутреннем кортексе (В) и примордия корня в наружном кортексе. А, В — *Vicia hirsuta*, С — *Phaseolus vulgaris*, обработка гипохлоридом и окрашивание метиленовой синью (Spaink, 1996).

инвазии у этих бобовых в целом такая же, как у *Neptunia*. В зависимости от внешних условий, *A. fluminensis* и *S. rostrata* могут формировать клубеньки как на стеблях, так и на корнях (Ndoye et al., 1994; Loureiro et al., 1995) и в этих клубеньках наблюдаются различные пути инфекции.

Andira inermis — деревянистое бобовое растение, клубеньки которого обладают интересным примитивным свойством: переход ризобий в растительную цитоплазму и образование симбиосом не наблюдается и ризобии поддерживаются в длинных стабильных инфекционных нитях, которые занимают существенную часть цитоплазматического пространства в хозяйских клетках. Интересно, что такая же структура выявлена и для клубеньков небобового *Parasponia*. Обобщая данные о структуре клубеньков у деревянистых бобовых, можно отметить (de Faria et al., 1987), что стабильные инфекционные нити присутствуют в 12 изученных родах, включая всех представителей подсемейства Caesalpinioideae и некоторых представителей Papilionoideae (в т.ч. *Andira*), но ни одного представителя подсемейства Mimosoideae. На основании структурного изучения клубеньков *Andira*

показано, что распространение бактерий через межклеточные пространства может быть не связано с инфекционными нитями. При пересечении клеточных границ инфекционные нити не образуются. Ризобии проникают в клетки развивающегося клубенька путем интрузий клеточной стенки и затем окружаются материалом клеточной стенки и мембран, формируя постоянные инфекционные нити, внутри которых происходит азотфиксация.

III.A.4. Обобщения

Ввиду чрезвычайного разнообразия механизмов инфекции, наблюдаемого у бобовых, можно описать существенные свойства их клубеньков в форме лишь ограниченного числа обобщений.

1. Колонизация тканей хозяина включает рост бактерий в межклеточных пространствах; во многих случаях происходит модификация развития клеточной стенки, обеспечивающая размещение эндосимбиотических бактерий.

2. Ризобии индуцируют деления кортикальных клеток, приводящие к развитию ряда новых тканей (в совокупности образующих клубенок), в котором центральная ткань колонизирована бактериями, а проводящие пучки расположены на периферии.

3. После колонизации тканей и клеток начинается азотфиксация, которая является эндосимбиотическим взаимодействием: она индуцируется низкой концентрацией кислорода в компартменте, который может быть описан как внутриклеточный, но экстрацитоплазматический.

4. Внутреннее строение хозяйской клетки, содержащей ризобии, весьма изменчиво у разных бобовых, но бактерии всегда окружены (по одиночке или группами) симбиотической или перибактероидной мембраной. Она, по-видимому, контролирует метаболические взаимодействия между эндосимбиотическими бактериями и цитоплазмой растительной клетки.

5. Клубеньки лишены корневого чехлика и не проявляют геотропизма.

III.A.5. Симбиоз ризобий с небобовыми

Ассоциация *Rhizobium* с небобовым *Parasponia andersonii* впервые описана Триником (Trinick, 1979), который отметил, что клубеньки обладают центральной проводящей системой, а инфицированные клетки занимают разбухшую кортикальную зону вокруг центрального пучка. Эта структура более напоминает модифицированные боковые корни, чем клубеньки бобовых. Клубеньки *Parasponia* сходны с коралловидными клубеньками актиноризных растений. На ранних стадиях взаимодействия ризобий с небобовым хозяином наблюдаются модификации корневых волосков. Однако проникновения через них ризобий не выявлено. Инфекция происходит через межклеточные пространства в основании индуцируемых многоклеточных корневых волосков (Lancelle, Torrey, 1984) и инфекционные нити переходят от клетки к клетке в пролиферирующей кортикальной ткани корня. Весьма существенно, что ризобии не освобождаются из инфекционных нитей в форме симбиосом, но остаются в морфологически специализированных "фиксационных нитях". Позднее были выявлены существенные различия между толстостенными инвазионными инфекционными нитями, которые проникают через кортикальные клетки, и тонкостенными нитями, в которых предположительно происходит азотфиксация (Smith et al., 1986). Можно предположить, что растение имеет две программы развития: одна для поддержания ризобий в фазе инвазии, другая для их поддержания в фазе азотфиксации. Степень структурного и функционального различия "фиксационных нитей" и симбиосом является предметом обсуждения (Becking, 1992).

III.B. СИМБИОЗ РАСТЕНИЙ С АКТИНОМИЦЕТАМИ

Актиноризный симбиоз возникает в результате взаимодействия между актиномицетами *Frankia* и деревянистыми двудольными растениями, принадлежащими к 8 различным семействам (Benson, Silvester, 1993). Результатом симбиоза является формирование актиноризных клубеньков, в которых *Frankia* обычно растет в форме гиф и кроме того может формировать симбиотические структуры, везикулы, в которых происходит азотфиксация (Simonet et al., 1990; Baker, Mullin, 1992).

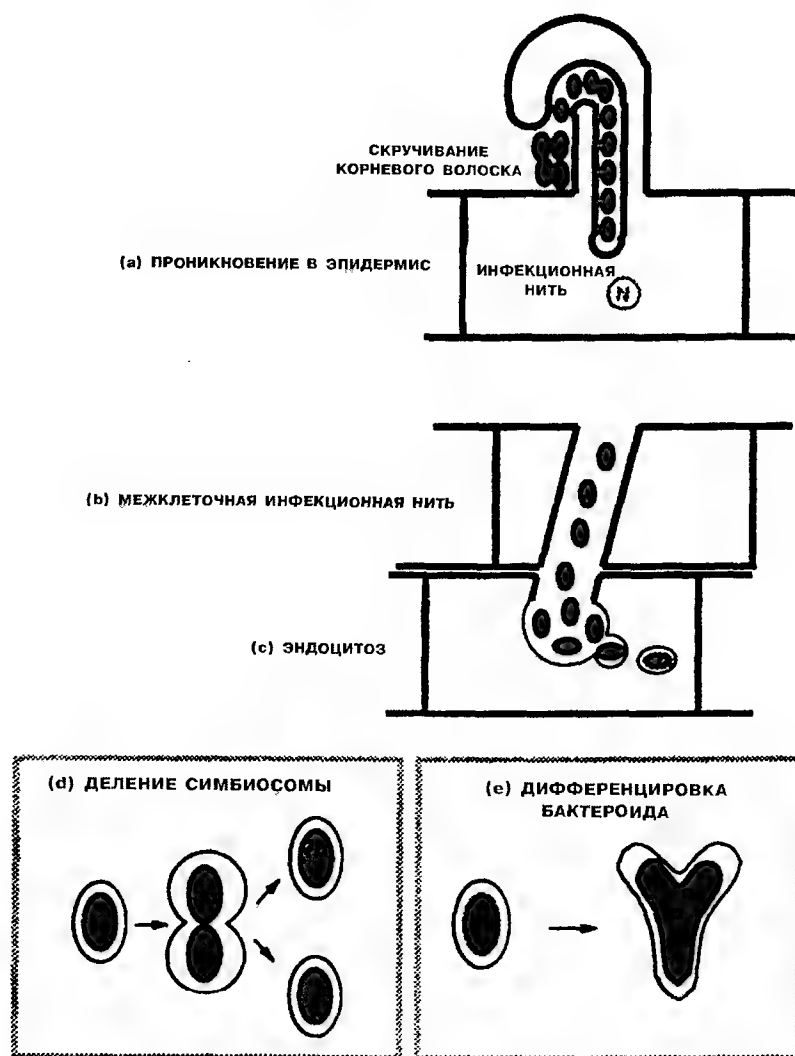


Рисунок 5. Развитие эндосимбиотической системы при взаимодействии гороха (*Pisum sativum*) с *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Kannenberg, Brewin, 1994). N — ядро растительной клетки.

В зависимости от растения-хозяина, *Frankia* может инфицировать корень двумя путями. Первый путь инфекции, через корневые волоски, характерен для *Alnus*, *Casuarina*, *Comptonia* и *Myrica* (Torrey, 1976; Callaham et al., 1979; Berry et al., 1986). Второй путь, межклеточное проникновение, характерен для *Elaeagnus* и *Ceanothus* (Miller, Baker, 1985; Liu, Berry, 1991). При инфекции *Frankia* через корневые волоски наблюдается формирование трубчатых структур, напоминающих инфекционные нити бобовых (Berry, Sunell, 1990). *Frankia*, как и *Rhizobium*, индуцируют митотические деления клеток кортекса корня проксимально по отношению к инфицированному корневому волоску. Это приводит к формированию так называемого предклубенька (Burgess, Peterson, 1987), функции которого неясны. В дополнение, клеточные деления индуцируются в перicycle и приводят к формированию клубенькового примордия, как и при формировании бокового корня. Примордий развивается в долю корневого клубенька, в котором специализирован-

ные клетки оказываются плотно заполненными микросимбионтом, окруженным мембраной, происходящей из плазматической мембраны хозяина (Berry, Sunell, 1990). В отличие от ризобий, *Frankia* находятся внутри структур, подобных инфекционным нитям, и не переходят в цитоплазму хозяйской клетки. Хотя *Frankia*, как и ризобии, индуцируют клеточные деления в кортексе корня, только клеточные деления, индуцируемые в перицикле, приводят к формированию истинного примордия клубенька. Для актиноризных клубеньков, как и для клубеньков бобовых, примордии формируются преимущественно напротив протоксилемного полюса стеллы корня (Callaham, Torgue, 1977).

В случае межклеточного проникновения и колонизации межклеточных пространств (Miller, Baker, 1985; Liu, Berry, 1991) гифы *Frankia* проникают в корень и распространяются между клетками эпидермиса. Это не приводит к формированию предклубенька, но сопровождается межклеточной колонизацией кортекса корня, клеточные деления индуцируются в перицикле и приводят к формированию клубенькового примордия.

III.B.1. Тканевая организация симбиоза

Актиноризные клубеньки — многолетние структуры, состоящие из нескольких долей (Bond, 1974). Их главное отличие от клубеньков бобовых отражается в тканевой организации. Каждая доля актиноризного клубенька представляет собой модифицированный боковой корень с центральным проводящим пучком. В отличие от бокового корня, актиноризный клубенек имеет поверхностную перидерму, лишен корневого чехлика и содержит как инфицированные, так и неинфицированные кортикальные клетки. Рост этих долей является недетерминированным за счет наличия

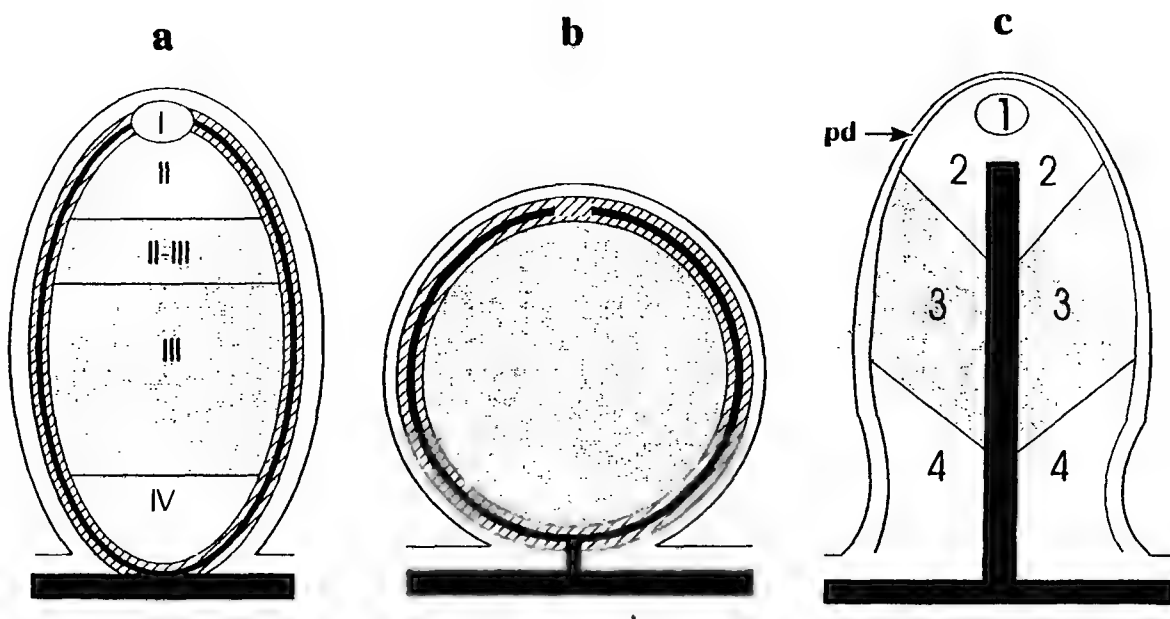


Рисунок 6. Основные типы азотфиксирующих клубеньков.

а — недетерминированный клубенек бобовых с 5 зонами в центральной части (Vasse et al., 1990). I — апикальная меристема, II — зона префиксации (инфицирование растительных клеток), II-III — интерзона (индукция азотфиксации; Yang et al., 1991), III — зона азотфиксации, IV — зона старения (деградация симбиозом с бактериоидами);

б — детерминированный клубенек бобовых — все клетки в центральной части находятся на одной стадии развития;

с — доля актиноризного клубенька *Alnus glutinosa* с расположением зон, аналогичным недетерминированному клубеньку (Schwinzer et al., 1982; Ribeiro et al., 1995); интерзона отсутствует.

апикальной меристемы, постоянно дифференцирующейся в проксимальном направлении (Bergu, Sunell, 1990). Показано, что доли актиноризного клубенька могут быть подразделены на зоны, соответствующие последовательным стадиям развития симбиоза (Ribeiro et al., 1995, рис. 6,с). Зона 1 — меристема — представлена мелкими делящимися клетками, не содержащими микросимбионта. Зона 2 — зона инфекции соответствует зоне префиксации в клубеньках бобовых и содержит увеличенные кортикальные клетки. Инфицированные клетки постепенно заполняются гифами и превосходят по размеру неинфицированные клетки (Lalonde, 1979; Schwintzer et al., 1982). После заполнения инфицированных клеток гифами на их концах или ответвлениях формируются скручивания, называемые провезикулами (Fontanie et al., 1984). В зоне 3 (фиксации) провезикулы преобразуются в везикулы, в которых синтезируется нитрогеназа — фермент, восстанавливающий атмосферный азот в аммоний (Huss-Daneil, Bergman, 1990). В зоне 4 (старения) наблюдается деградация кортикальных клеток вместе с находящимися в них везикулами.

В отличие от бобово-ризобияльной системы, молекулярные механизмы образования актиноризного симбиоза практически не изучены. Поскольку скручивание корневых волосков может происходить без прямого контакта с *Frankia* (Burggraaf et al., 1983; Prin, Rougier, 1987), предполагается секреция микроорганизмом молекул, вызывающих, подобно Nod-факторам ризобий, деформацию корневых волосков.

IV. Регуляция образования клубеньков растением

Описано множество растительных мутантов, у которых нарушено инфицирование или образование клубеньков (Caetano-Anolles, Gresshoff, 1991). Наибольшее их число выявлено у гороха и сои. Интересно, что у некоторых из этих мутантов нарушено образование арбускулярной микоризы (Gianinazzi-Pearson, 1996), что говорит о наличии общих стадий развития этих симбиозов.

Число клубеньков, образуемых у актиноризных и бобовых растений, строго регулируется растением по меньшей мере на двух разных уровнях (Caetano-Anolles, Gresshoff, 1991). На ранних стадиях симбиоза развитие большинства инфекций и клубеньковых примордиев блокируется, что ограничивает число клубеньков, образуемых в чувствительной зоне. После первых успешных инфекций и образования примордиев нодуляция во вновь возникающих частях корня уже не происходит — феномен известный как авторегуляция числа клубеньков.

Этилен является основным компонентом первого уровня регуляции, так как мутанты, нечувствительные к этому фитогормону, образуют повышенное число клубеньков (Penmetsa, Cook, 1997). Соединения, блокирующие рецепцию или синтез этилена, также могут увеличивать число клубеньков. Однако эти мутанты имеют нормальный механизм авторегуляции, и повышенное число клубеньков образуется лишь на небольшом участке корневой системы. Этилен не только контролирует число клубеньков, но и поставляет в корень позиционную информацию. В клубеньках “дикого типа” примордии практически всегда образуются напротив полюсов протоксилемы. Однако у растений, обработанных ингибиторами рецепции (синтеза) этилена, или у нечувствительных к этилену мутантов клубеньки формируются напротив полюсов флоэмы (Heidstra et al., 1997). Эти наблюдения согласуются с тем, что этилен синтезируется в районе клубенькового перичкла напротив полюсов флоэмы.

Мутанты, дефектные по авторегуляции, образуют большое число клубеньков по всей корневой системе (фенотип Nod^{+++}). С их использованием было показано, что процесс включает несколько сигнальных событий. Очевидно, существует фактор, выделяемый примордиями и действующий системно на другие части растения. Опыты с прививками между растениями дикого типа и мутантами показали, что фенотип Nod^{+++} обычно определяется стеблем, а не корнем, то есть надземная часть играет важную роль в авторегуляции. Наиболее вероятно, что сигнал, формируемый в листьях в ответ на сигнал из клубеньков, определяет взаимодействие между тканями надземной части и корня, приводящее к подавлению образования новых клубеньков. Сигналлинг между надземной и подземной частями растения сложен и, возможно, включает ингибирующие и стимулирующие компоненты (Gresshoff et al., 1988, 1989; Francisco, Harper, 1995).

Детерминанты хозяйской специфичности бобовых растений изучены пока недостаточно. Предполагается, что у гороха важную роль в хозяйской специфичности играет лектин PSL, связывающийся с маннозой (Diaz et al., 1995, 1996). Перенос из гороха в клевер гена *psl*, контролирующего синтез этого лектина, придает клеверу способность формировать клубеньки с ризобиями гороха. Однако, функция этого лектина неясна. В процессе развития клубеньков бобовых лектины локализируются в трех разных местах, и их возможные функции могут быть связаны с распределением зон инфекции по поверхности корней. Можно предположить, что некоторые из лектинов определяют прикрепление ризобий к корням в зоне инфекции. В клубеньковом примордии они могут стимулировать митотическую активность, снижая порог чувствительности к ризобияльным Nod-факторам. В то же время, в центральной части зрелого клубенька лектины могут функционировать как запасные азотные соединения (Brewin, Kardailsky, 1997).

V. Благодарности

Авторы признательны Джанет Спрент за обсуждение сравнительной анатомии бобовых.

VI. Литература

- Allen O.N., Allen E.K. (1981) The Leguminosae, Macmillan Publishing Company, London, 831 pp.
- Appleby C.A. (1992) Sci. Progr. V. 76, p. 365-398.
- Baker D.D., Mullin B.C. (1992) In: G. Stacey, R.H. Burris, H.J. Evans (eds.) Biological Nitrogen Fixation, Chapman & Hall, New York, pp. 259-292.
- Bakhuizen R. (1988) The Plant Cytoskeleton in the *Rhizobium*-Legume Symbiosis, PhD Thesis, Leiden University, The Netherlands.
- Becking J.H. (1992) In: G. Stacey, R.H. Burris, H.J. Evans (eds.) Biological Nitrogen Fixation, Chapman & Hall, NY, pp. 497-559.
- Bensen D.R., Silvester W.B. (1993) Microbiol. Rev. V. 57, p. 293-319.
- Berry A.M., McIntyre L., McCully M.E. (1986) Can. J. Bot. V. 64, p. 292-305.
- Berry A.M., Sunell L.A. (1990) In: C.R. Schwintzer and J.D. Tjepkema (eds.) The Biology of *Frankia* and Actinorhizal Plants, Academic Press, New York, pp. 61-81.
- Bond G. (1974) In: A. Quispel (ed.) The Biology of Nitrogen Fixation, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, pp. 342-378.
- Brewin N.J. (1991) Annu. Rev. Cell Biol. V. 7, p. 191-226.
- Brewin N.J., Downie J.A., Young J.P.W. (1992) In: J. Lederberg (ed.) Encyc. Microb., V. 3, Academic Press Inc., San Diego, pp. 239-248.
- Brewin N.J., Kardailsky J.V. (1997) Trend in Plant Sci. V. 2, p. 92-98.
- Burgess D., Peterson R.L. (1987) Can. J. Bot. V. 65, p. 1647-1657.
- Burggraaf A.J.P., van der Linden J., Tak T. (1983) Plant and Soil. V. 74, p. 175-188.
- Caetano-Anolles G., Gresshoff P.M. (1991) Annu. Rev. Microbiol. V. 45, p. 345-382.
- Callahan D., Newcomb W., Torrey J.G., Peterson R.L. (1979) Bot. Gaz. V. 140 (suppl), S1-S9.
- Callahan D., Torrey J.G. (1977) Can. J. Bot. V. 55, p. 2306-2318.
- Chandler M.R. (1978) J. Exp. Bot. V. 29, p. 749-755.
- Chandler M.R., Date R.A., Roughley R.J. (1982) J. Exp. Bot. V. 33, p. 47-57.
- De Faria S.M., Hay G.T., Sprent J.I. (1988) J. Gen. Microbiol. V. 134, p. 2291-2296.
- De Faria S.M., Lewis G.P., Sprent J.I., Sutherland J.M. (1989) New Phytol. V. 111, p. 607-619.
- De Faria S.M., McIntroy S.G., Sprent J.I. (1987) Can. J. Bot. V. 65, p. 553-558.
- Denarie J., Debelle F., Prome J.C. (1996) Annu. Rev. Biochem. V. 65, p. 503-535.
- Diaz C.L., Spaink H.P., Kijne J.W. (1996) In: G. Stacey, B. Mullin, P.M. Gresshoff (eds.) Biology of Plant-Microbe Interactions, ISMPMI, St. Paul, pp. 399-402.
- Diaz C.L., Spaink H.P., Wijffelman C.A., Kijne J.W. (1995) Mol. Plant Microbe Interact., p. 348-356.
- Doyle J.J. (1994) Annu. Rev. Ecol. Syst. V. 25, p. 325-349.
- Fontaine M.F., Lancelle S.A., Torrey J.G. (1984) J. Bacteriol. V. 160, p. 921-927.
- Francisco P.J. Jr., Harper J.E. (1995) Plant Science. V. 107, p. 167-176.
- Franssen H.J., Vijn I., Yang W.-C., Bisseling T. (1992) Plant Mol. Biol. V. 19, p. 89-107.
- Gianinazzi-Pearson V. (1996) Plant Cell. V. 8, p. 1871-1883.
- Gresshoff P.M., Delves A.C. (1986) In: A.D. Blonstein, P.J. Kings (eds.) Plant Gene Research III, Springer Verlag, Wien, p. 159-206.
- Gresshoff P.M., Krotzkey A.J., Mathews A., Day D.A., Schuller K.A., Olsson J.E., Delves A.C., Carrol B.J. (1988) J. Plant Physiol. V. 132, p. 417-423.
- Gresshoff P.M., Olsson J.E., Li Z.Z., Caetano-Anolles G. (1989) Curr. Top. Plant Biochem. Plant Physiol. V. 8, p. 125-139.

- Heidstra R., Yang W.-C., Yalcin Y., Peck S., Emons A., Van Kammen A., Bisseling T. (1997) *Development*. V. 124, 1781-1787.
- Huss-Danell K., Bergman B. (1990) *New Phytol.* V. 116, p. 443-455.
- Jacobsen-Lyon K., Ostergaard J.E., Jorgensen J.E., Marcker K.A., Peacock W.J., Dennis E.S. (1995) *Plant Cell*. V. 7, p. 213-223.
- Kijne J.W. (1992) In: G. Stacey, R.H. Burris, H.J. Evans (eds.) *Biological Nitrogen Fixation*, Chapman & Hall, NY, London, p. 349-398.
- Kozik A., Heidstra R., Horvath B., Kulikova O., Tikhonovich I., Noel E.T.H., Van Kammen A., Lie T.A., Bisseling T. (1995) *Plant Science*. V. 108, p. 41-49.
- Lalonde M. (1979) *Bot. Gaz.* V. 140 (suppl.), S35-S43.
- Lancelle S.A., Torrey J.G. (1984) *Can. J. Bot.* V. 63, p. 25-35.
- Lewin A., Rosenberg C., Meyer Z.A., Wong C.H., Nelson L., Monen J.F., Stanley J., Dowling D.N., Denarie J., Broughton W.J. (1987) *Plant Molecular Biology*. V. 8, p. 447-459.
- Lewis-Henderson W.R., Djordjevic M.A. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 2791-2799.
- Lie T.A. (1978) *Ann. Appl. Biol.* V. 88, p. 445-487.
- Liu Q., Berry A.M. (1991) *Protoplasma*. V. 163, p. 82-92.
- Loureiro M.F., James E.K., Sprent J.I., Franco A.A. (1995) *New Phytol.* V. 130, p. 531-544.
- Marvel D.J., Torrey J.G., Ausubel F.M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 84, p. 1319-1323.
- Miller I.M., Baker D.D. (1985) *Protoplasma*. V. 128, p. 107-119.
- Nap J.-P., Bisseling T. (1990) *Science*. V. 250, p. 948-954.
- Ndoye I., de Billy F., Vasse J., Dreyfus B., Truchet G. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 1060-1068.
- Newcomb W.E. (1976) *Can. J. Bot.* V. 54, p. 2163-2186.
- Newcomb W.E. (1981) In: K.L. Giles, A.G. Atherly (eds.) *Biology of the Rhizobiaceae*, Academic Press, NY, p. 247-297.
- Pawlowski K., Bisseling T. (1996) *Plant Cell*. V. 8, p. 1899-1913.
- Penmetsa V.R., Cook D.R. (1997) *Science*. V. 275, p. 527-530.
- Prin Y., Rougier M. (1987) *Plant Physiol. (life Sci. Adv.)* V. 6, p. 99-108.
- Pueppke S.G., Broughton W.J. (1996) In: Li, Lie, Chen, Zhou (eds.) *Diversity and Taxonomy of Rhizobia*, China Agricultural Sciencetech Press, Beijing, p. 126-127.
- Ribeiro A., Akkerman A.D.L., Van Kammen A., Bisseling T., Pawlowski K. (1995) *Plant Cell*. V. 7, p. 785-794.
- Rolfe B.G., Gresshoff P.M. (1988) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* V. 39, p. 297-319.
- Roth L.E., Stacey G. (1989a) *Eur. J. Cell Biol.* V. 49, p. 24-32.
- Roth L.E., Stacey G. (1989b) *Eur. J. Cell Biol.* V. 49, p. 13-23.
- Sadowsky M.J., Cregan P.B. (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 58, p. 720-723.
- Schwintzer C.R., Berry A.M., Disney L.D. (1982) *Can. J. Bot.* V. 60, p. 746-757.
- Simonet P., Normand P., Hirsch A.M., Ackermans A.D.L. (1990) In: P.M. Gresshoff (ed.) *The Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation*, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 77-109.
- Smith C.A., Skvirsky R.C., Hirsch A.M. (1986) *Can. J. Bot.* V. 64, p. 1474-1483.
- Soltis D.E., Soltis P.S., Morgan D.R., Swensen S.M., Mullin B.C., Dowd J.M., Martin P.G. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 92, p. 2647-2651.
- Spaink H.P. (1996) *Crit. Rev. Plant Sci.* V. 15, p. 559-582.
- Sprent J.I., Raven J.A. (1992) In: G. Stacey, R.H. Burris, H.J. Evans (eds.) *Biological Nitrogen Fixation*, Chapman and Hall, NY, p. 461-496.
- Subba-Rao N.S., Matcos P.F., Baker D., Pankratz H.S., Palma J., Dazzo F.B., Sprent J.I. (1995) *Planta*. V. 196, p. 311-320.
- Swensen S. (1996) *Amer. J. Bot.* V. 83, p. 1503-1512.
- Torrey J.G. (1976) *Amer. J. Bot.* V. 63, p. 335-344.
- Trinick M.J. (1979) *Can. J. Microbiol.* V. 25, p. 565-578.
- Turgeon B.G., Bauer W.D. (1985) *Planta*. V. 163, p. 328-349.
- Van de Wiel C., Scheres B., Franssen H., Van Lierop M.J., Van Lammeren A., Bisseling T. (1990) *EMBO J.* V. 9, p. 1-7.
- Van Kammen A. (1984) *Plant Mol. Biol. Rep.* V. 2, p. 43-45.
- Vasse J., de Billy F., Camut S., Truchet G. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 4295-4306.
- Vest G., Caldwell B.E. (1972) *Crop Sci.* V. 12, p. 692-694.
- Yang W.-C., Horvath B., Hontelez J., Van Kammen A., Bisseling T. (1991) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 4, p. 464-468.
- Young J.P.W., Haukka K.E. (1996) *New Phytol.* V. 133, p. 87-94.
- Young J.P.W., Johnston A.W.B. (1989) *Trends Ecol. Evol.* V. 4, p. 341-349.

Генетическая организация и транскрипционная регуляция генов ризобий, контролирующих образование клубеньков

Шламан Х., Филлипс Д., Кондороши Е.

I.	Введение.....	389
	I.A. Гены, контролирующие образование клубеньков.....	389
	I.B. Гены, определяющие хозяйскую специфичность клубенькообразования.....	390
	I.C. Регуляция генов клубенькообразования.....	390
II.	Организация генов клубенькообразования.....	391
	II.A. Транскрипция и трансляция.....	391
	II.B. Физические карты.....	392
III.	Промоторы, содержащие <i>nod</i> -box.....	392
IV.	Транскрипционные регуляторы NodD и SyrM.....	396
	IV.A. Экспрессия генов <i>nodD</i> и <i>syrM</i>	396
	IV.B. Структура и функции белков NodD и SyrM.....	396
V.	Факторы, активирующие гены клубенькообразования.....	399
	V.A. Выявление активных индукторов	399
	V.B. Синтез и выделение индукторов	401
	V.C. Соотношение структуры и активности индукторов.....	402
VI.	Взаимодействие белков NodD с последовательностями <i>nod</i> -box	403
VII.	Позитивная регуляция генов клубенькообразования	405
VIII.	Негативная регуляция генов клубенькообразования.....	405
	VIII.A. Репрессор NodR.....	405
	VIII.B. Белок NodA.....	406
IX.	Другие факторы, регулирующие гены клубенькообразования.....	407
X.	Экспрессия генов клубенькообразования на поздних стадиях симбиоза.....	408
XI.	Выводы и перспективы.....	409
XII.	Благодарности.....	409
XIII.	Литература.....	411

I. Введение

I.A. ГЕНЫ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ ОБРАЗОВАНИЕ КЛУБЕНЬКОВ

Способность бактерий, относящихся к родам *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* и *Azorhizobium*, в совокупности называемых ризобиями, к образованию на растениях клубеньков определяется генами обоих партнеров. Гены ризобий, определяющие клубенькообразование (нодуляцию, от англ.: nodulation) или гены, регулируемые совместно с ними, обозначали как *nod*, *nol* и *noe* с добавлением одной заглавной буквы. Одними из первых были описаны гены *nodA*, *nodB* и *nodC* (Rossen et al., 1984; Torok et al., 1984), тогда как *noeL* у штамма NGR234 *Rhizobium* sp. выявлен сравнительно недавно (Freiberg et al., 1997). Гомологичным генам, найденным у разных видов бактерий, давали одинаковые обозначения. Названия белков-продуктов этих

генов имеют те же названия, что и гены, но пишутся с большой буквы (например, *NodA* — продукт гена *nodA*). Единственным геном, название которого не укладывается в общую схему, является *symM* (от: *symbiotic regulator*), гомологичный *nodD* и участвующий как в синтезе экзополисахаридов, так и в регуляции генов нодуляции (Mulligan, Long, 1989).

Первые гены нодуляции были выявлены у *Sinorhizobium meliloti* и *Rhizobium leguminosarum* (биотипы *viciae* и *trifolii*). Дальнейшее изучение этих генов было облегчено тем, что их удалось локализовать на крупных плаزمиде (Sym-плазмиде) этих ризобий (Johnston, Beringer, 1977). У *S. meliloti* данные плазмиды составляют в сумме около 30% размера хромосомы (Banfalvi et al., 1981). В случае изгнания Sym-плазмид ризобии теряют способность формировать клубеньки, тогда как при переносе Sym-плазмид в эти мутанты образование клубеньков восстанавливается (Johnston et al., 1978; Beynon et al., 1980; Banfalvi et al., 1981; Hooykaas et al., 1981; Kondorosi et al., 1982; van Brussel et al., 1982; Djordjevic et al., 1983). Перенос Sym-плазмид из ризобий в *Agrobacterium tumefaciens* и *Phyllobacterium myrsinacearum* также приводит к способности формировать клубеньки (Hooykaas et al., 1981, 1982; van Veen et al., 1988; Rodrigues-Quinones et al., 1989). Создание таких генетических инструментов как широкоспецифичные клонирующие и космидные векторы (Ditta et al., 1980; Friedman et al., 1982), конструирование космидных библиотек, комплементация и клонирование мутаций, нарушающих нодуляцию, неспецифический или направленный транспозоновый мутагенез в сочетании с методиками обмена маркеров (Beringer et al., 1978; Buchanan-Wollaston, 1979; Meade et al., 1982), а также фаговая трансдукция (Pees et al., 1986; Wijffelman et al., 1985) привели к идентификации участков генома, ответственных за образование клубеньков, а затем и первых генов нодуляции (Downie et al., 1983, 1985; Torok et al., 1984; Schofield et al., 1984; Rossen et al., 1984; Kondorosi et al., 1984; Fisher et al., 1985; Djordjevic et al., 1985). Секвенирование ДНК и опыты по комплементации показали, что одни гены нодуляции сходны у всех видов ризобий, а другие — имеются лишь у определенных видов или даже штаммов. Первые были названы общими генами нодуляции, а вторые — генами хозяйской специфичности нодуляции или *hns* (Kondorosi et al., 1984; Horvath et al., 1986; Putnoky, Kondorosi, 1986). В промоторах многих генов нодуляции выявлена консервативная последовательность *nod*-box, обеспечивающая их координированную экспрессию (Rostas et al., 1986).

Ряд генов нодуляции был выявлен путем функциональной комплементации штаммов, дефектных по способности формировать клубеньки на одном или более хозяевах, а также путем выделения гомологов известных генов или секвенирования участков ДНК, сцепленных с последовательностями *nod*-box. В ряде случаев установлена биохимическая активность, характерная для продуктов генов нодуляции, однако соответствующих генов выявлено не было. Недавно разработанные высокопроизводительные методы автоматического секвенирования позволили определить последовательности целых Sym-плазмид. Например, показано, что Sym-плаزمид штамма NGR234 *Rhizobium* sp., имеющая размер 536 т.п.н., содержит около 400 открытых рамок считывания, среди которых многие соответствуют генам нодуляции (Freiberg et al., 1997).

1.В. ГЕНЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ХОЗЯЙСКУЮ СПЕЦИФИЧНОСТЬ КЛУБЕНЬКООБРАЗОВАНИЯ

Каждый вид или биотип ризобий вступает в симбиоз с определенным кругом растений-хозяев, на основании чего выделен ряд групп перекрестной инокуляции (глава 18). Хозяйская специфичность, проявляемая при образовании клубеньков, определяется обменом сигнальными молекулами между растениями и бактериями. Классификация бактерий, основанная на хозяйской специфичности, не коррелирует с их филогенией (глава 1), однако она позволяет изучать процесс нодуляции с точки зрения генетики растительно-микробных взаимодействий, которая и будет рассмотрена ниже.

1.С. РЕГУЛЯЦИЯ ГЕНОВ КЛУБЕНЬКООБРАЗОВАНИЯ

Большинство генов клубенькообразования, не участвующих в регуляции, практически не экспрессируются в отсутствие растения-хозяина и на обычных лабораторных средах (Mulligan, Long,

1985; Spaink et al., 1987b; Djordjevic et al., 1987). Механизмы активации транскрипции были изучены путем слияния генов нодуляции с геном *lacZ Escherichia coli*, кодирующим β-галактозидазу (Miller, 1972). Эти опыты показали, что транскрипция генов нодуляции зависит от бактериального белка NodD и растительного флавоноида, являющегося коиндуктором (эффектором). Ключевой стадией регуляции является связывание белка NodD с последовательностью *nod*-box. Кроме того, выявлен ряд альтернативных систем регуляции генов образования клубеньков. Среди них наиболее изучена двухкомпонентная система NodVW *Bradyrhizobium japonicum*. Кроме того, у *Sinorhizobium fredii* выявлена система регуляции для генов нодуляции, не имеющих в промоторе последовательности *nod*-box, но активируемых белком NodD и флавоноидами.

Экспрессия генов нодуляции строго регулируется на уровне транскрипции, так как чересчур активная их экспрессия может нарушать образование клубеньков (Knight et al., 1986; Kondorosi et al., 1989). В бактериоидах гены нодуляции обычно неактивны. Их тонкая регуляция достигается благодаря механизмам негативной авторегуляции гена *nodD*, чувствительности белков NodD к различным флавоноидам, а также за счет транскрипционного репрессора NodR. У *B. japonicum* белок NodA оказывает не прямое негативное воздействие на транскрипцию генов нодуляции. Факторы среды, такие как ионы кальция, аммония, органические кислоты или pH, также влияют на экспрессию этих генов.

II. Организация генов клубенькообразования

У ряда видов, таких как *R. leguminosarum* (биотипы *viceae* и *trifolii*), *S. meliloti*, *R. etli*, *R. galegae*, *R. tropici*, NGR234 *Rhizobium* sp., гены нодуляции находятся на Sym-плазмидах и лишь регуляторный ген *nolR* локализован в хромосоме (Kondorosi et al., 1989). У других ризобий (*B. japonicum*, *A. caulinodans*, *S. fredii*, *M. loti*) все гены нодуляции находятся в хромосоме. Некоторые гены (*nodA*, *nodB*, *nodC*) присутствуют у ризобий в одной копии, тогда как другие (*nodM* (*glmS*), *nodP*, *nodQ*, *nodT*) — в нескольких копиях (Surin, Downie, 1988; Schwedock, Lond, 1989; Baev et al., 1991; Rivilla, Downie, 1994). В ряде случаев гены нодуляции формируют кластеры, состоящие из нескольких оперонов, многие из которых консервативны у разных ризобий (рис. 1). В состав одного оперона может входить до 12 генов, например оперон *nodYABCSUIJnolMNOndZ* у *B. japonicum* имеет протяженность около 12 т.п.н. Гены *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodD*, *nodI*, *nodJ* имеются у всех ризобий, тогда как другие гены нодуляции специфичны для определенных видов или даже штаммов.

II.A. ТРАНСКРИПЦИЯ И ТРАНСЛЯЦИЯ

Направление транскрипции генов нодуляции обычно определяют, изучая экспрессию их слияний с геном-репортером или путем картирования РНК-транскриптов. Кроме того, оно может быть выяснено путем анализа организации и структуры генов. Сайты старта транскрипции идентифицированы для нескольких генов нодуляции и состоят из 1–4 нуклеотидов (рис. 2). У *S. meliloti* выявлены сходные сайты старта транскрипции генов *nodA* и *nodH* при регуляции как зависимым от эффектора белком NodD1, так и конститутивным белком NodD3 (Mulligan, Long, 1989). Лидерные последовательности, имеющие размер свыше 100 нуклеотидов, имеются практически во всех генах, причем наиболее протяженные лидеры (659 и 499 нуклеотидов) обнаружены в генах *S. meliloti nodD3* и *syrM* (Barnett et al., 1996). В этих нетранслируемых районах отсутствуют какие-либо консервативные или функционально значимые последовательности (Kalinowski, Long, 1996).

Как и у всех бактериальных генов, рамки считывания большинства генов нодуляции начинаются с кодона ATG, соответствующего старту трансляции, однако в некоторых генах были найдены aberrантные стартовые кодоны: GTT (*nodS M. loti*) и TTG (*nodT R. leguminosarum*, *nodD A. caulinodans*). Предполагаемые последовательности Шайн-Далгарно, выявленные либо непосредственно перед началом рамки считывания, либо путем функционального анализа, показывают, что эти стартовые кодоны функционально активны. В некоторых случаях стоп-кодоны и стартовые

кодона смежных генов перекрываются (*nodAB*, *nodFE*, *nodIJ* у *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *nodCS* у *B. japonicum*). Для генов *nodAB* и *nodEF* *S. meliloti* выявлена сопряженная трансляция (Torok et al., 1984; Horvath et al., 1986).

II. В. ФИЗИЧЕСКИЕ КАРТЫ

Организация генов нодуляции проанализирована у многих видов ризобий (рис. 1). Гены *nodA*, *nodB*, *nodC* обычно составляют единый оперон. В то же время, у *M. loti*, *R. etli* и штамма N33 *Rhizobium* sp. выявлен либо оперон *nodAC* и дополнительная рамка считывания, гомологичная *nodB*, либо оперон *nodBC* с рамкой, гомологичной *nodA* (Vazquez et al., 1991; Scott et al., 1996; Clouter et al., 1996b). Обычно в этом опероне первым является *nodA*, однако у *Bradyrhizobium* ему предшествует дополнительный ген: *nodY* (у *B. japonicum*) или *nodK* (у *Bradyrhizobium* sp. *Parasponia*) (Scott, 1986).

Часто за геном *nodC* следует еще ряд генов, входящих в тот же оперон. Обычно это гены *nodI*, *nodJ*, *nodS*, *nodU* (в последовательности *IJ-SU*, хотя порядок этих пар генов может быть разным). У штамма NGR234 *Rhizobium* sp. гены *nodSU* составляют отдельный оперон. Кроме того, в данный оперон могут входить гены *nodT* (*R. leguminosarum* bv. *trifolii*), *nodX* (*R. leguminosarum* bv. *viciae*, штамм TOM), *nodMNodZ* (*B. japonicum*), *nodZnoeCD* (*A. caulinodans*), *nodOnoeI* (*Rhizobium* sp., штамм NGR234).

Ген *nodD* присутствует в одной копии у *R. leguminosarum* (биотипы *viciae* и *trifolii*), *A. caulinodans*, однако у других ризобий может быть найдено несколько его копий. В большинстве случаев *nodD* составляет отдельную транскрипционную единицу и лишь у *R. etli* выявлен состоящий из 2 генов оперон *nodEnodD1*. Ген *syrM*, найденный в количестве 1 копии у *S. meliloti* и 2 копий у *Rhizobium* sp. NGR234, проявляет гомологию с *nodD*, хотя и не столь сильную, как разные *nodD*-гены (Barnett, Long, 1990; Kondorosi et al., 1991a; Schlaman et al., 1992b).

Присутствие многих генов нодуляции ограничено лишь определенными видами ризобий. Так, у *S. meliloti* выявлены гены *nodFEGPQ* и *nodH*, организованные в 2 оперона (ранее *nodFEG* обозначали *hsnABC*, а *nodH* — *hsnD*; Horvath et al., 1986). Гены *nodFE* выявлены также у *R. leguminosarum* (биотипы *viciae* и *trifolii*), а гомолог *nodE* найден у *R. tropici*. Эти гены образуют единый оперон с *nodL* у *R. leguminosarum* bv. *viciae* и с *nodRL* у *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. У *S. meliloti* ген *nodL* отделен от *nodFE* и образует единый оперон вместе с *noeAB*. Гены *nodP* и *nodQ* у *S. meliloti* обычно расположены вместе; они идентифицированы также у *R. tropici* (единый оперон с *nodH*) и у штамма BR816 *Rhizobium* sp. (у него *nodH* пока не выявлен).

Гены *nodM* и *nodN* обычно входят в один оперон, который может включать и другие гены. Ими могут быть: *nodT* (*R. leguminosarum* bv. *viciae*), *nodX* (*R. leguminosarum* bv. *trifolii*), *nodFGHI* (*S. meliloti*). Ген *nodO* пока выявлен лишь у *R. leguminosarum* bv. *viciae* и *Rhizobium* sp. BR816. Ген *nodR* выявлен у *R. leguminosarum* bv. *trifolii* в составе оперона *nodFERL*, однако участие этого гена в контроле нодуляции пока не доказано. Оперон *nodVW* найден только у штамма *B. japonicum*. Ген *nodZ* может составлять отдельную транскрипционную единицу (*R. etli* и *M. loti*), либо входит в один оперон с *nodABC* (*B. japonicum*, *A. caulinodans*) или *noeLnoI* (*Rhizobium* sp. NGR234).

Гены, обозначенные *nol* или *noe*, обычно обнаруживают лишь у единичных видов ризобий, и только ген *nolR* выявлен у *R. leguminosarum* bv. *viciae* (штамм TOM), *S. meliloti*, *S. fredii* и у штамма NGR234 *Rhizobium* sp. В ряде случаев в опероны генов нодуляции входят дополнительные небольшие открытые рамки считывания, функции и гомологи которых неизвестны.

III. Промоторы, содержащие *nod*-box

Промоторы генов нодуляции не проявляют гомологии с хорошо известными бактериальными промоторами, содержащими классические последовательности в положениях -10 , -35 или -70 . Поэтому РНК-полимераза *Escherichia coli* не способна узнавать промоторы генов нодуляции (Fischer et al., 1987a). Однако в промоторах большинства этих генов находится консенсусная последовательность *nod*-box, которая необходима для их экспрессии (Rostas et al., 1986; Schofield,

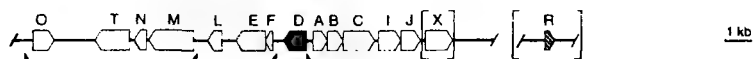
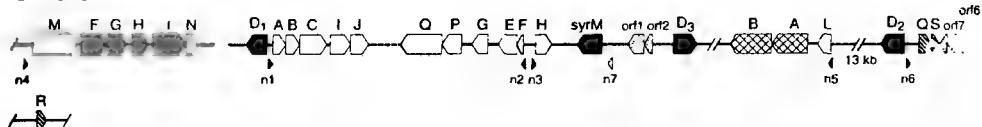
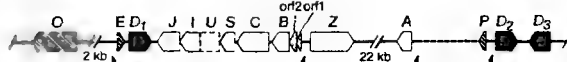
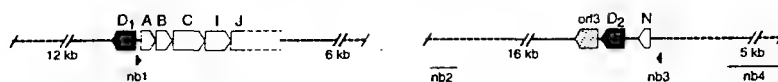
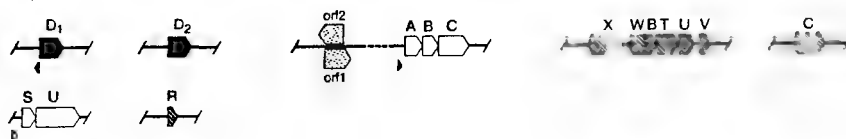
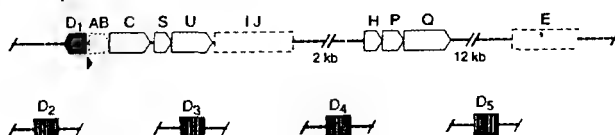
Watson, 1986; Spaink et al., 1987a). Экспрессия генов, индуцируемая с промотора *nod*-box белками NodD, взаимодействующими с флавоноидами, изучена гораздо лучше, чем экспрессия с промоторов, не содержащих *nod*-box. Единственным исключением является промотор *nodW* *S. fredii*, охарактеризованный с помощью делеций (Gu et al., 1997). Индукция экспрессии генов нодуляции флавоноидами еще не является доказательством присутствия в их промоторе последовательности *nod*-box, о чем говорят результаты изучения генов *nolX* и *nolBTU* *S. fredii* и NGR234 *Rhizobium* sp. (Meinhardt et al., 1993; Balatti et al., 1995; Bellato et al., 1996, 1997; Gu et al., 1997).

Только для части последовательностей *nod*-box (рис. 1, 2) показано участие в регуляции транскрипции. Вблизи некоторых из этих последовательностей не было выявлено генов нодуляции. Консенсус *nod*-box состоит из консервативных модулей, содержащих 7, 8 и 26 нуклеотидов, которые разделены 2 и 6 неконсервативными нуклеотидами, соответственно (вместе они составляют коровую последовательность). На расстоянии 1-13 нуклеотидов ниже основного модуля (26 нуклеотидов) находится менее консервативная последовательность АТ(Т)АГ, в которой остаток G является наиболее изменчивым. Другие последовательности, находящиеся вблизи *nod*-box, не являются консервативными. Наиболее сильно измененная последовательность *nod*-box найдена в промоторе гена *nodA* *A. caulinodans* (Goethals et al., 1992). Последовательности, проявляющие слабую гомологию с *nod*-box, выявлены в промоторах некоторых *nodD*-генов: *nodD1* *B. japonicum* (Wang, Stacey, 1991), *symM* *S. meliloti* (Barnett et al., 1996), *nodD3* *M. loti* (Scott et al., 1996). Последовательности *nod*-box, вблизи которых отсутствуют открытые рамки считывания, выявлены у *S. fredii* и *A. caulinodans* (Appelbaum et al., 1988; Goethals et al., 1990). У штамма NGR234 *Rhizobium* sp. вблизи *nod*-box выявлен ген *y4mC*, функция которого неясна (Freiberg et al., 1997).

В последовательностях *nod*-box выявлено несколько мотивов (рис. 2; Goethals et al., 1992). Мотив LysR, охарактеризованный как T-N₁₁-A, обычно присутствует в 3 копиях. Он выявлен во всех промоторах, узнаваемых регуляторными белками семейства LysR, к которому принадлежит NodD (Schell, 1993). Этот мотив важен для вызываемой коиндуктором транскрипции *nodA* и *nodF*, а также для связывания белка NodD с промотором гена *nodD*, перекрывающимся с промотором *nodA*, но не нужен для связывания NodD с промотором гена *nodF* (Goethals et al., 1992). Эти нуклеотиды важны для связывания с белком NodD при авторегуляции его синтеза, однако не нужны для индукции транскрипции *nodABCII* или *nodFEL*. Кроме того, последовательность *nod*-box содержит 2-3 элемента, состоящих из инвертированного повтора с основной структурой А-Т-С-Н₉-G-А-Т.

Последовательности, важные для индукции, выявлены путем делеционного картирования (Spaink et al., 1987a) и с использованием точковых мутаций (Goethals et al., 1992). Коровый район (49 нуклеотидов) важен так же, как и вышележащая последовательность (21 нуклеотид), содержащая АТ(Т)АГ. Расстояния между консервативными модулями очень важны для функционирования мотива LysR. Это хорошо показано при изучении промотора *n6* *S. meliloti*, для которого транскрипция нижележащего гена *nolQ* не индуцируется флавоноидами, хотя и взаимодействует с NodD (Kondorosi et al., 1989). В этой последовательности выявлена делеция 1 нуклеотида между 2 и 3 модулями, отсутствует связывающий район АТТАГ и второй предполагаемый LysR мотив в модуле из 26 нуклеотидов. Выявлены 2 единичные нуклеотидные замены (в модулях из 7 и из 26 нуклеотидов) в *nod*-box последовательности оперона *nodFEG* *R. leguminosarum* bv. *viceae*, которые приводят к его конститутивной экспрессии.

Выявление последовательности *nod*-box еще не говорит о присутствии индуцибельного промотора. Например, в промоторе *nodSU* *S. fredii* выявлен *nod*-box, однако не показано индуцируемой транскрипции (Krishnan et al., 1992). Sym-плазмида штамма NGR234 *Rhizobium* sp. (pNGR234a) содержит 19 последовательностей *nod*-box, однако неясно, все ли они функционально активны (только 5 сцеплены с генами *nodABCII*, *nolOnoeI*, *nodSU*, *nodZnoeLnolK*, *nolL*, *noeE*). Транскрипционный анализ показал, что 11 предполагаемых последовательностей *nod*-box симбиотически активны (Freiberg et al., 1997). 2 последовательности *nod*-box, выявленные вблизи NifA-зависимых активаторных последовательностей или σ 54-зависимых промоторов, индуцируются флавоноидами и белком NodD у бактерий, находящихся в клубеньках.

R. leguminosarum bv. *viciae**R. leguminosarum* bv. *trifolii**S. meliloti**R. etli**M. loti**R. galegae**S. fredii**R. tropici*

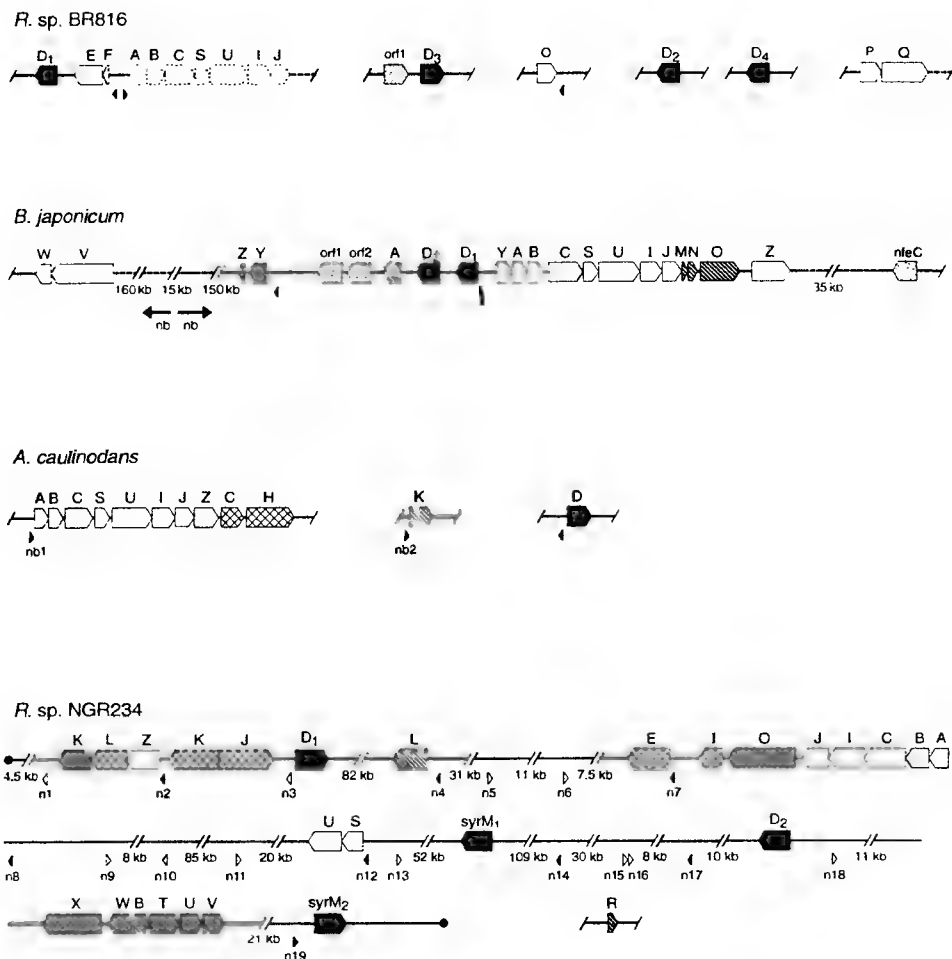


Рисунок 1. Организация генов клубенькообразования у ризобий.

Гены и направления их транскрипции обозначены широкими стрелками (гены с неизвестным направлением транскрипции – прямоугольниками; гены, для которых имеются лишь предварительные данные по гибридизации и частичной последовательности, обведены пунктиром). Окраска: белая – *nod*-гены, черная – разные аллели *nodD*, в том числе *sytM*, косая штриховка – *nod*-гены, перекрестная штриховка – *noe*-гены, штриховка точками – неизвестные гены и открытые рамки считывания. Положения регуляторных последовательностей *nod*-box показаны треугольными стрелками под линиями карты.

Сайты старта транскрипции, выявленные в нескольких оперонах, содержащих *nod*-box, находятся на расстоянии 23–25 нуклеотидов ниже от наиболее крупного консервативного модуля (26 нуклеотидов, рис. 2).

IV. Транскрипционные регуляторы NodD и SyrM

IV.A. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *NODD* И *SYRM*

У многих ризобий ген *nodD* транскрибируется в направлении, противоположном одному из оперонов, регулируемых этим геном, причем их промоторы часто перекрываются (рис. 1). Например, промотор гена *nodD*(1) перекрывается с промотором *nod*(Y)ABCII у *B. japonicum*, *R. leguminosarum* bv. *viciae* и *S. meliloti*. Следовательно, старт транскрипции *nodD*(1) оказывается в пределах последовательности *nod*-box или вблизи нее (рис. 2). Возможная роль дивергентно транскрибируемых промоторов состоит в локальном увеличении концентрации РНК-полимеразы, что существенно для транскрипции недостаточно активных промоторов. У *R. leguminosarum* bv. *trifolii* последовательность *nod*-box, находящаяся перед геном *nodA*, перекрывается со стартовым кодоном *nodD*, что говорит о тесном сопряжении транскрипции *nodABCII* и *nodD*.

У штаммов дикого типа уровень экспрессии *nodD* обычно низок: у *R. leguminosarum* bv. *viciae* образуется 20–80 молекул белка NodD на клетку (Schlaman et al., 1989). У *R. leguminosarum* (биотипы *viciae* и *trifolii*), но не у *S. meliloti*, экспрессия гена *nodD* негативно авторегулируется вне растения (Rossen et al., 1985; Spaink et al., 1987a). Анализ последовательности ДНК позволил выявить перед геном *nodD* *R. leguminosarum* bv. *viciae* инвертированные повторы, обозначенные как А-элементы. Эти элементы, отсутствующие в промоторе гена *nodD* *S. meliloti*, имеют слабую гомологию с *nod*-box и тем не менее являются сайтами для авторегуляции (Mao et al., 1994). Интересно, что *nod*-box выявлен перед промотором гена *nodD* *R. etli* (Davis, Johnston, 1990), *S. fredii* (Appelbaum et al., 1988) и *B. japonicum* (Wang, Stacey, 1991), а также *syrM2*, но не *syrM1* у штамма NGR234 *Rhizobium* sp. (Freiberg et al., 1997), что обеспечивает их активацию белком NodD1 и определенными флавоноидами (Davis, Johnston, 1990; Wang, Stacey, 1991; Smit et al., 1992; Freiberg et al., 1997). У *S. meliloti* сложная регуляторная сеть образована множественными копиями *nodD*, включая *syrM* (рис. 6). Транскрипция генов *nodD1* и *nodD2* находится под негативным контролем NodR. Экспрессия *nodD3* положительно регулируется собственным продуктом, а также белками SyrM и NodD1 (Mulligan, Long, 1989; Maillet et al., 1990; Kondorosi et al., 1991a; Rushing et al., 1991). Экспрессия *syrM* контролируется его собственным продуктом, белками NodD2 и NodD3, а также гипотетическим регулятором, обозначенным на рисунке 6 как CII (Kondorosi et al., 1991a; Swanson et al., 1993). Важно отметить, что ген *syrM* *S. meliloti* также имеет в промоторе *nod*-box (Barnett et al., 1996).

Опыты в системах *in vitro* показали формирование различных комплексов между белками и промоторами *nodD* и *syrM* у *R. leguminosarum* bv. *viciae* и *S. meliloti* (рис. 6). Некоторые из этих белков идентифицированы как NodD и NodR, природа других менее ясна (Burn et al., 1987; Kondorosi et al., 1989; Schlaman et al., 1992a). Комплекс C1 у *R. leguminosarum* bv. *viciae*, возможно, участвует в экспрессии *nodABCII*, но не *nodD*, хотя он и формируется перед опероном *nodMNT*. За исключением CII, который может быть активатором (Kondorosi et al., 1991a), не известны белки, участвующие в комплексах C и CI *S. meliloti* и играющие роль в регуляции *nodD* и *syrM*.

IV.B. СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ *NODD* И *SYRM*

Белки NodD и SyrM функционируют как активаторы генов нодуляции, находящихся под контролем промоторов, содержащих *nod*-box. Не все NodD-белки вносят одинаковый вклад в экспрессию этих генов. Например, белки NodD2 *Rhizobium* sp. NGR234, *B. japonicum* BR816 и *R. tropici* не играют заметной роли в транскрипции генов нодуляции (Broughton et al., 1991; Gottfert et al., 1992; van Rhijn et al., 1993). На основании данных о гомологии белки NodD и SyrM классифицированы как члены семейства LysR (Henikoff et al., 1988; Schell, 1993). Эта постоянно увеличива-

ющаяся группа состоит из ДНК-связывающих белков, которые в большинстве случаев действуют как активаторы транскрипции. Все они имеют мотив “спираль-поворот-спираль” вблизи N-конца и обладают специфической ДНК-связывающей активностью. Хотя их способность индуцировать транскрипцию требует наличия дополнительных факторов, эти белки не являются членами двух-компонентных регуляторных систем (Stock et al., 1989; Parkinson, 1993). Поэтому они обеспечивают одновременно рецепцию сигналов и связывание с ДНК.

Коиндукторами NodD-белков, необходимых для активации генов нодуляции, являются растительные флавоноиды (рис. 3). Исключение составляют белки NodD3 и SyrM, функционирующие совместно в независимой от растения системе активации (Mulligan, Long, 1989; Kondorosi et al., 1991a). Возможно, что белки NodD непосредственно взаимодействуют с растительными флавоноидами, хотя это до сих пор не показано. Однако, существует ряд косвенных доказательств этого предположения. Каждый вид ризобий реагирует на определенный набор флавоноидов, обеспечивающих высокие уровни индукции генов нодуляции, и это свойство зависит главным образом от белка NodD (Horvath et al., 1987; Spaink et al., 1987b; Zaat et al., 1987). Например, белок NodD1 *Rhizobium* sp. NGR234 определяет реакцию с широким спектром флавоноидов, тогда как активную транскрипцию *nod*-генов *R. leguminosarum* bv. *trifolii* вызывают только 7,4'-дигидроксифлаван и лютеолин (Bassam et al., 1988). Эти различия согласуются с широкой и узкой хозяйской специфичностью соответствующих ризобий (глава 18). Имеется несколько примеров того, что перенос гена *nodD* между разными видами *Rhizobium* приводил к смене специфичности реципиента на специфичность донора (Horvath et al., 1987; Spaink et al., 1987b; Surin, Downie, 1988; Bender et al., 1988; Vargas et al., 1990). Более того, гибридные NodD-белки, состоящие из последовательностей *S. meliloti* и *R. leguminosarum* bv. *viciae*, могут совмещать специфичность обоих родителей (Horvath et al., 1987; Spaink et al., 1989a). Различные NodD-белки, синтезируемые в одном штамме ризобий, часто проявляют разную, хотя и частично перекрывающуюся специфичность к флавоноидам (Gyorgypal et al., 1988, 1991a, 1991b; Honma et al., 1990; Phillips et al., 1992).

Возможно, что при взаимодействии с флавоноидами происходят конформационные изменения белков NodD. Об этом говорят данные по выделению мутантных и гибридных NodD-белков, которые могут индуцировать транскрипцию вне зависимости от присутствия флавоноидов (FITA-белки, от *flavonoid independent transcription activation*) (Burn et al., 1987; McIver et al., 1989; Spaink et al., 1989a, 1989c). Изучение мутантов показало, что индукторные молекулы могут взаимодействовать с C-концевой частью белка (Spaink et al., 1989c). Более того, NodD-белки отличаются от других белков семейства LysR именно C-концевой частью, тогда как N-концевая часть у них сходна.

Предполагаемое взаимодействие NodD с флавоноидами происходит на внутренней стороне мембраны бактериальной клетки, о чем говорит накопление флавоноидов во внутренней мембране (Recourt et al., 1989). Кроме того, белок NodD локализован полностью или частично во внутренней мембране *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Schlaman et al., 1989) и *S. meliloti* (Kondorosi et al., 1989). 2 района белка NodD проявляют существенную гомологию с сайтом связывания лигандов рецепторов эстрагенов, причем один из этих районов находится в мембране (Gyorgypal, Kondorosi, 1991). До сих пор неясно, является ли взаимодействие флавоноидов с NodD временным или постоянным.

Структуру белка NodD не следует представлять как простую сумму ДНК-связывающего и флавоноид-чувствительного доменов. Анализ двойных мутантов по гену *nodD*, а также гибридных аллелей этого гена показал, что для рецепции сигнала необходимы аминокислоты, расположенные в различных частях белка (Burn et al., 1989; Spaink et al., 1989c). Структуры белков NodD и SyrM пока не определены, что связано с их малым количеством в клетке, иммунологическим родством с GroEL-подобными белками-шаперонами при сверхпродукции NodD, а также его субклеточной локализации (Fisher, Long, 1989; Ogawa, Long, 1995).

Белок NodD может функционировать не только как активатор, но и как репрессор транскрипции *nod*-генов. Это наиболее четко проявляется при негативной авторегуляции *nodD* *R. leguminosarum* bv. *viciae* и bv. *trifolii* (Rossen et al., 1985; Spaink et al., 1989c). Более того, экспрессия гена *rhiA*, локализованного на Sym-плазмиде *R. leguminosarum* bv. *viciae* и кодирующего активно синтезируемый белок размером 24 кДа, находится под негативным контролем NodD (Economou et al., 1989). Экспрессия *exo*-генов у *S. fredii* репрессируется белком NodD2 (Appelbaum et al., 1988).

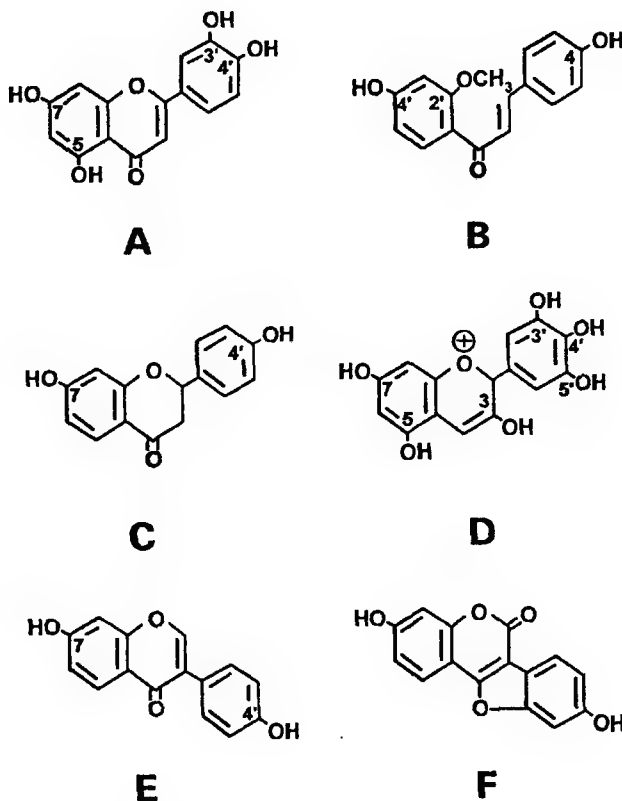


Рисунок 3. Некоторые флавоноидные индукторы экспрессии генов клубенькообразования: лютеолин (А), халькон 4,4'-дигидроксн-2'-метокснхалькон (В), флаванон ликвиритнгенн (С), антоцианидин дельфннндин (D), изофлавои дайдзеин (Е), куместан куместрол (F). Положения атомов углерода соответствуют таблице 1.

V. Факторы, активирующие гены клубенькообразования

V.A. ВЫЯВЛЕНИЕ АКТИВНЫХ ИНДУКТОРОВ

Основные коиндукторы генов нодуляции — флавоноиды — синтезируются практически всеми растениями, включая цветковые, голосеменные, папоротники и мхи, но не синтезируются бактериями (Stafford, 1990). Флавоноиды выявлены во многих корневых экстрактах (Rao, 1990), но в эксудатах корней они впервые обнаружены у сои (D'Arcy-Lameta, 1986). Первые доказательства участия флавоноидов в регуляции *nod*-генов ризобий были представлены на международной конференции в мае 1986 г. (Lugtenberg, 1986), а затем появились и развернутые статьи (Firmin et al., 1986; Peters et al., 1986; Redmond et al., 1986; Kossak et al., 1987; Spaink et al., 1987b). Эти работы были выполнены с помощью слияний *nodABC-lacZ* и подтвердили информацию о том, что в индукции генов *nodABC* участвуют факторы, выделяемые растениями (Innes et al., 1985; Mulligan, Long, 1985; Rossen et al., 1985; Zaat et al., 1987). В течение нескольких лет у различных видов бобовых было выявлено множество флавоноидов, являющихся эффекторами генов нодуляции (табл. 1). Флавоноиды присутствуют в растениях в форме гликозидов, содержащих по меньшей мере один остаток сахара, и как агликоны, не содержащие сахара. Обе формы флавоноидов могут быть индукторами *nod*-генов (Hungria et al., 1991a; Smit et al., 1992). Для лютеолин-7-О-гликозида показано, что этот важный компонент оболочки семян люцерны не

Таблица 1. Агликоны, продуцируемые бобовыми и активирующие транскрипцию генов нодуляции ризобий (в некоторых случаях для синтеза индуктора необходимо присутствие ризобий)

Бобовые	Источник	Вещество	Ссылка
Альдоновые кислоты			
<i>Lupinus albus</i>	Семена	Эритрониновая и тетрониновая кислота	Gagnon, Ibrahim, 1998
Бетацины			
6 видов <i>Medicago</i>	Семена	Стагидрин, тригонеллин	Phillips et al., 1992, 1995
Флавоноиды			
<i>Medicago sativa</i>	Семена	Лютеолин (5,7,3',4'-тетрагидроксифлавонон)	Peters et al., 1996
		Хризоеириол (5,7,4'-тригидрокси-3'-метоксифлавонон)	Hartwig et al., 1990a
<i>Trifolium repens</i>	Корни	4,4'-дигидрокси-2'-метоксихалькон, 7,4'-дигидроксифлавонон, ликвиритегенин (7,4'-дигидроксифлавонон)	Maxwell et al., 1989
		7,4'-дигидроксифлавонон, гералдон (7,4'-дигидрокси-3'-метоксифлавонон), 4'-гидрокси-7-метоксифлавонон	Redmond et al., 1986
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Семена	Дельфинидин (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавилюм), кемпферол (3,5,7,4'-тетрагидроксифлавонон), мальвидин (3,5,7,4'-пентагидрокси-3',5'-диметоксифлавилюм), мирицетин (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавонон), петунидин (3,5,7,4',5',-пентагидрокси-3'-метоксифлавилюм), кверцетин (3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавонон)	Hungria et al., 1991a
	Корни	Эриодктиол (5,7,3',4'-тетрагидроксифлавонон), генистеин (5,7,4'-тригидроксиизофлавонон), нарингенин (5,7,4'-тригидроксифлавонон)	Hungria et al., 1991a
<i>Pisum sativum</i>	Семена	Апигенин (5,7,4'-тригидроксифлавонон), Эриодктиол (5,7,3',4'-тетрагидроксифлавонон)	Firmin et al., 1986
<i>Glycine max</i>	Проростки	Дайдзеин (7,4'-дигидроксиизофлавонон), генистеин (5,7,4'-тригидроксиизофлавонон)	Koslak et al., 1987
	Корни	Куместрол	D'Arcy-Lameta, 1986; Kape et al., 1992
<i>Vicia sativa</i> subsp. <i>nigra</i>	Корни	3,5,7,3'-тетрагидрокси-4'-метоксифлавонон, 7,3'-дигидрокси-4'-метоксифлавонон	Zaat et al., 1989
		4,2',4'-тригидрооксихалькон, 4,4'-дигидрокси-2'-метоксихалькон, нарингенин (5,7,4'-тригидроксифлавонон), ликвиритегенин (7,4'-дигидроксифлавонон), 7,4'-дигидрокси-3'-метоксифлавонон, 5,7,4'-тригидрокси-3'-метоксифлавонон, 5,7,3'-тригидрокси-4' метоксифлавонон	Recourt et al., 1991

индуцирует *nod*-гены, однако внеклеточная β -глюкозидаза семян и клеток *S. meliloti* превращает его в лютеолин — активный индуктор (Hartwig, Phillips, 1991).

Были выявлены два нефлавоноидных фактора, активирующих *nod*-гены *S. meliloti* — стагидрин и тригонеллин, относящиеся к группе бетаинов, синтезируемых во многих тканях растений при осмотическом стрессе (Jones et al., 1986; Phillips et al., 1992; табл. 1, рис. 4). Эти вещества найдены в не проросших семенах различных видов люцерны (Phillips et al., 1995). Свойствами бетаинов, важными для функционирования в качестве индукторов *nod*-генов, является растворимость в воде и присутствие в больших количествах в семенах бобовых. Для индукции *nod*-генов требуются гораздо большие концентрации бетаинов, чем флавоноидов, однако это различие компенсируется значительным количеством бетаинов, выделяемых из семенной кожуры и определяющих формирование первых клубеньков. Относительная роль бетаинов и флавоноидов в индукции *nod*-генов неясна, но важно отметить, что бетаины представлены на семенах различных видов люцерны более широко, чем флавоноиды (Phillips et al., 1995). Например, неясно, могут ли семена *Medicago littoralis* и *M. truncatula* экскретировать флавоноидные индукторы *nod*-генов, так как флавоноидов в их семенах очень мало.

Показано, что две недавно идентифицированные альдоновые кислоты — эритроновая и тетроновая (табл. 1) могут быть естественными индукторами генов нодуляции (Gagnon, Ibrahim, 1998). Эти вещества, выделенные из эффузатов семян люпина, индуцируют синтез Nod-факторов у *R. lupini*. Как и в случае бетаинов, для активации *nod*-генов необходимы очень низкие (миллимолярные) концентрации этих кислот. Кроме того, тетроновая кислота индуцирует образование Nod-факторов у *M. loti* и *S. meliloti*. Структурное сходство этих веществ со стагидрином (рис. 4), а также их присутствие в семенах люпина, является еще одним доказательством важности нефлавоновых факторов в регуляции *nod*-генов. Возможно, что при изучении других бобовых будут выявлены и принципиально иные активаторы.

Некоторые простые фенольные вещества, которые обычно выявляют в составе лигнина, также индуцируют *nod*-гены ризобий (La Strange et al., 1990; Kape et al., 1991). Несмотря на широкое распространение этих веществ у растений, пока отсутствуют прямые доказательства их выделения корнями или семенами бобовых. Концентрации фенольных веществ, необходимые для индукции *nod*-генов *B. japonicum*, намного выше, чем концентрации флавоноидов (Kape et al., 1991).

В.В. СИНТЕЗ И ВЫДЕЛЕНИЕ ИНДУКТОРОВ

Различные классы флавоноидов, индуцирующих *nod*-гены ризобий, включают хальконы, флаваноны, флавоны, флавонолы, изофлавоноиды, куместаны и антоцианидин (табл. 1, рис. 3), образующиеся из фенилпропаноидных молекул и вовлекаемые в флавоноидный путь биосинтеза посредством халькон-синтазы (CHS) (Stafford, 1990). Выделение флавоноидных индукторов *nod*-генов связано с их конкурентным синтезом в стерильных корнях люцерны (Maxwell, Phillips, 1990). Однако присутствие гомологичных ризобий вызывает увеличение количества и изменения качественного состава флавоноидов, эксудиремых викой (van Brussel et al., 1990; Recourt et al., 1991), люцерной (Dakora et al., 1993a), фасолью (Dakora et al., 1993b), соей (Schmidt et al., 1994) и клевером (Lawson et al., 1996). Это связано с быстрой и кратковременной активацией CHS (Recourt et al., 1991; Mathesius et al., 1996). Опыты с соей и викой показали, что этот эффект могут вызвать очищенные Nod-факторы (Spaink et al., 1991; Schmidt et al., 1994). Наибольшие количества флавоноидных индукторов выделяются кончиком корня люцерны (Peters, Long, 1988) и сои (Graham, 1991), что может быть связано с отшелушиванием растительных клеток (Hawes, 1990). Хотя и было выявлено усиление экскреции флавоноидов при азотном голодании люцерны (Coronado et al., 1995), доказательства связи этого эффекта с образованием клубеньков отсутствуют. У томатов азотный стресс активрует синтез флавоноидов посредством механизма транскрипционной регуляции (Bongue-Bartelsman, Phillips, 1995). Возможно, что синтез флавоноидов является источником дополнительных углеродных скелетов, образуемых при деаминировании фенилаланина в

условиях азотного голодания. Кроме того, у растений флавоноиды могут играть роль регуляторов роста (Jacobs, Rubery, 1988; Djordjevic et al., 1997), что объясняет их связь со многими внешними воздействиями.

Стагидрин и тригонеллин формируются за счет двух независимых групп биосинтетических реакций, не связанных с фенилпропаноидным путем (Phillips et al., 1994). Таким образом, люцерна имеет по меньшей мере три пути для синтеза индукторов генов нодуляции. Индукторы фенольной природы могут быть продуктами фенилпропаноидного метаболизма.

V.C. СООТНОШЕНИЕ СТРУКТУРЫ И АКТИВНОСТИ ИНДУКТОРОВ

Преобладание гидроксирования в положениях 7- и 4' у флавоноидных индукторов *nod*-генов (табл. 1, рис. 3) было показано уже в ранних работах (Rolfe, 1988). Например, анализ экспрессии слияний *nodA-lacZ* у ризобий, содержащих ген *nodD* из *R. leguminosarum* bv. *viciae* показал, что флакон, у которого отсутствуют замещения в трех флавоноидных кольцах, неактивен, тогда как 7-гидроксифлакон обеспечивает около половины от максимального уровня индукции, получаемого при добавлении лютеолина, апигенина, нарингенина или эриодиктиола (Zaat et al., 1987). В целом, белки NodD ризобий, обладающих широкой хозяйской специфичностью, отзываются на широкий спектр флавоноидов (Gyorgypal et al., 1991a, 1991b). Например, у штамма NGR234 *Rhizobium* sp. присутствие гидроксильного остатка в положении C7 флавоноидного скелета необходимо для активации белка NodD1. В то же время, NodD-белки ризобий, обладающих узким спектром хозяев, требуют более специфических замещений в коровой структуре флавоноида, включая положения C5 и C4' (Peters, Long, 1988; Gyorgypal et al., 1988, 1991a; Hartwig et al., 1989, 1990a). Изучение более 1000 флавоноидов и их структурных аналогов показало, что гидроксирование положения C7 обеспечивает связывание с активным сайтом, поскольку эти соединения оказывают сильное влияние на индукцию и ингибирование генов нодуляции (Cunningham et al., 1991).

Не все молекулы индуктора регулируют гены нодуляции одинаковым образом, и белки NodD значительно различаются по способности взаимодействовать с флавоноидами. У *B. japonicum* некоторые гликозиды сами индуцируют транскрипцию гена *nodD1*, но не оперона *nodYABCSUIJ* (Smit et al., 1992). Лютеолин индуцирует транскрипцию *nodABCII* только у тех штаммов *S. meliloti*, которые содержат дополнительные гены *nodD1*, однако 2'-метоксихалькон индуцирует транскрипцию у штаммов, содержащих дополнительные копии как *nodD1*, так и *nodD2* (Hartwig et al., 1990b). Стагидрин и тригонеллин индуцируют гены нодуляции только у штаммов *S. meliloti*, содержащих дополнительные копии *nodD2* (Phillips et al., 1992). Штаммы *R. etli*, содержащие дополнительные копии трех различных генов *nodD*, не проявляют специфичности к различным флавоноидам фасоли, поскольку все они индуцируют транскрипцию генов нодуляции в присутствии каждого изученного соединения (Hungria et al., 1992). Хотя очевидно, что регуляторные эффекты растительных сигналов варьируют, опубликованные данные позволяют сделать весьма ограниченное количество четких выводов относительно регуляции *nod*-генов. Это связано с тем, что в большинстве опытов использовали бактериальные штаммы, которые содержат по меньшей мере одну копию каждого гена *nodD*, а также множественные копии индивидуальных *nodD*-генов.

Ранние работы, показавшие, что бобовые могут влиять на экспрессию *nod*-генов ризобий посредством выделения ингибиторов (Firmin et al., 1986; Djordjevic et al., 1987), были подтверждены тем, что слабые индукторы генов нодуляции ризобий люцерны (7,4'-дигидроксифлакон, ликвиритигенин) снижают активность сильного индуктора (4,4'-дигидрокси-2'-метоксихалькон), присутствующего в этих же эксудатах (Hartwig et al., 1989). Попытки выяснить экологическое значение этого феномена осложняются тем, что активность индукции *nod*-генов в ризосфере низка (Leon-Barríos et al., 1993) и поэтому вряд ли ее дальнейшее снижение может быть полезным для растения. Кроме того, не все штаммы определенного вида ризобий одинаковым образом реагируют на флавоноиды (Kosslak et al., 1990). Например, транскрипция *nod*-генов у некоторых штаммов *B. japonicum* не ингибируется 7-гидрокси-5-метилфлавоном — синтетическим веществом, которое резко снижает уровень транскрипции у штамма USDA110 *B. japonicum* (Cunningham et al., 1991).

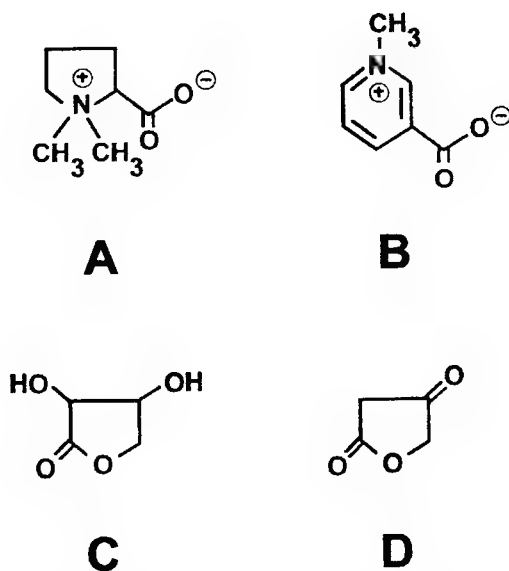


Рисунок 4. Нефлавоноидные индукторы генов клубенькообразования: стакигидрин (А), триоксалин (В), эфитронниковая кислота (С), тетрониновая кислота (D).

Поэтому представляется сомнительным, что у растений возникла способность ингибировать *nod*-гены ризобий, индуцируемые другими флавоноидами.

Эти данные показывают важность сравнения естественных индукторов и синтетических веществ, вызывающих сходный эффект. Трудность поиска естественных индукторов состоит в том, что используемые биотесты более чувствительны, чем аналитические методы идентификации веществ. Поэтому выявление естественного индуктора должно быть подтверждено опытом с очищенным химическим препаратом. Например, в экссудатах люцерны с помощью методов ^1H -ЯМР и FAB-MS обнаружены следы предполагаемого индуктора *nod*-генов формонетин-7-O-6''-O-малонногликозида, но необходимые для подтверждения препараты отсутствовали (Dakora et al., 1993a). Последующие работы показали, что данное соединение не является индуктором *nod*-генов *S. meliloti* (Coronado et al., 1995). Поэтому более корректные результаты может дать выявление предполагаемых индукторных молекул в растениях, а затем их поиск в экссудатах. Например, тритерпеноидные сапонины, составляющие до 3% массы корней люцерны (Massiot et al., 1988) сходны по структуре с флавоноидами. Ни одно из 4 изученных соединений этой группы не активировало гены нодуляции *S. meliloti* (данные авторов).

VI. Взаимодействие белков NodD с последовательностями *nod*-box

Механизм транскрипционной активации *nod*-генов включает 3 основных компонента: флавоноидный коиндуктор, транс-активирующий белок NodD и консервативный цис-элемент промотора — последовательность *nod*-box. Связывание белка NodD с последовательностью *nod*-box было показано путем анализа подвижности ДНК в геле (Hong et al., 1987; Kondorosi et al., 1989; Fisher, Long, 1989; Goethals et al., 1992; Schlaman et al., 1992a) и “футпринтинга” ДНК (Fisher, Long, 1989; Kondorosi et al., 1989). Связывание NodD с *nod*-box происходит независимо от присутствия флавоноидов, однако они необходимы для индукции транскрипции. Нельзя исключить, что различия в связывании наблюдаются только *in vivo*, но не *in vitro*, как это было показано для белка NahR, гомологичного NodD (Huang, Schell, 1991). Взаимодействие NodD с *nod*-промотором за-

щищает от ДНК-азы I район -75...-20, который покрывает весь *nod*-box, за исключением его наиболее чувствительной центральной части (Fisher, Long, 1989; Kondorosi et al., 1989). Делеции *nod*-box нарушают формирование ДНК-белкового комплекса, что говорит о необходимости всех консервативных модулей для регуляторного взаимодействия. Последовательности *nod*-box *B. japonicum* и *A. caulinodans*, наиболее резко отличающиеся от консенсуса, тем не менее, сохраняют способность связываться с NodD (Wang, Stacey, 1991; Goethals et al., 1992). Предполагается, что мишенью для связывания NodD является мотив T-N₁₁-A LysR-типа. Инсерции, делеции и точковые мутации в этом мотиве полностью или частично нарушают связывание *nod*-box *S. meliloti* и *A. caulinodans* с белком NodD (Goethals et al., 1992; Fisher, Long, 1993). У *R. leguminosarum* bv. *viceae* замены пар оснований в LysR-мотиве (*nodF*) нарушали флавоноид-зависимую промоторную активность, однако не влияли на связывание с NodD. Таким образом, для индукции промотора необходимо связывание NodD с интактной последовательностью *nod*-box. Более того, LysR-мотив может быть не единственным элементом, необходимым для этого связывания.

Белок NodD активен в димерной форме, то есть либо один димер взаимодействует с обоими модулями *nod*-box (Fisher, Long, 1993), либо каждый сайт-мишень взаимодействует с одним димером, в результате чего образуется тетрамер, связанный с *nod*-box (Wang, Stacey, 1991; Goethals et al., 1992). В случае правильности первой модели можно ожидать изгибания ДНК, хотя оно допустимо и в соответствии со второй моделью. Специфичное ДНК-белковое взаимодействие обычно сопровождается изгибанием ДНК (Harrington, 1992). Оно происходит на комплементарных поверхностях борозд, формирующих сайт для связывания путем точного стерического соответствия при взаимодействии регуляторных белков с мотивом "спираль-поворот-спираль". В соответствии с этим показано, что связыванием белка NodD3 *S. meliloti* с *nod*-промоторами происходит на одной стороне спирали ДНК и вызывает ее изгибание (Fisher, Long, 1993). Кроме того, шаперонины GroEL способствуют связыванию NodD с *nod*-box и могут быть вовлечены в дальнейшее взаимодействие NodD с компонентами аппарата транскрипции.

Формирование комплекса "NodD-*nod*-box" не является достаточным для активации транскрипции (за исключением флавоноид-независимых систем SyrM-NodD3 и FITA-NodD). Возможно, что флавоноиды активируют транскрипцию, вызывая дальнейшую модификацию ДНК-белковых комплексов. Об этом говорит различие профилей ДНК, полученных при обработке ДНК-азой I комплексов, подвергшихся или не подвергшихся воздействию флавоноидов (Kondorosi et al., 1989), а также усиление ДНК-белкового связывания *in vitro* (Goethals et al., 1992). Последнее свидетельствует в пользу прямого взаимодействия флавоноидов с ДНК-белковым комплексом. Другое предположение состоит в том, что взаимодействие с флавоноидами вызывает необратимое изменение белка NodD. В случае флавоноид-независимого взаимодействия с участием гибридного белка NodD-FITA (Spaink et al., 1989a, 1989c) или белков NodD3-SyrM ДНК-белковый комплекс может обеспечить взаимодействие с транскрипционным аппаратом даже в отсутствие индукторной молекулы. Это подтверждается различиями в футпринтах ДНК, полученных при воздействии белков NodD1 и NodD3 на промоторы *nod*-генов *S. meliloti* (Fisher, Long, 1989; Kondorosi et al., 1989).

Транскрипционная регуляция *nod*-генов может происходить по-разному. У штаммов *R. leguminosarum* bv. *viceae*, содержащих один ген *nodD* (рис. 1, 6), уникальный белок NodD взаимодействует с несколькими близкими, но не идентичными последовательностями *nod*-box (рис. 2). Их различие, определяющее изгибание ДНК и стерическое взаимодействие с белком, может определять иерархию образования ДНК-белковых комплексов. У видов ризобий, содержащих несколько разных аллелей *nodD* (например, у *S. meliloti*), все они могут участвовать в активации *nod*-генов. Конкуренция и стабильность этих белков при образовании комплексов с ДНК могут быть основными факторами, определяющими активность промоторов. Помимо формирования комплексов, транскрипция индуцибельных *nod*-генов зависит от аддитивных, синергических и ингибирующих воздействий индукторов. Формирование комплексов промоторов, содержащих *nod*-box, с индивидуальными NodD-белками может в разной степени зависеть от флавоноидов, что приводит к формированию комплексов, в разной степени обеспечивающих активацию транскрипции.

Взаимодействие NodD с *nod*-box может быть осложнено связыванием дополнительных регуляторных элементов с *nod*-box или с нижележащими последовательностями. Например, у *S. meliloti*

формирование ДНК-белкового комплекса находится под сильным влиянием репрессора NodR, который связывается с последовательностью, прилежащей к *nod*-box (Kondorosi et al., 1989). Более того, дополнительные комплексы, образуемые у *R. leguminosarum* bv. *viciae* (C1 и C2 на рис. 6), содержат белки, которые не проявляют сходства с NodD, и механизм их взаимодействия с комплексом “NodD-*nod*-box” неясен (Hong et al., 1987; Schlaman et al., 1992a).

VII. Позитивная регуляция генов клубенькообразования

Помимо регуляторных систем, содержащих белки NodD и SyrM, у ризобий выявлены системы, модулирующие экспрессию *nod*-генов, что обеспечивает оптимальную динамику образования клубеньков. Наиболее изучена система NodVW, выявленная пока только у *B. japonicum* (рис. 6) и активирующая промоторы *nodD1* и *nodYABCSUIJ* независимо от флавоноидов (Gottfert et al., 1992; Sanjuan et al., 1994). NodVW относится к числу двухкомпонентных регуляторных систем, состоящих из сенсора, локализованного во внутренней мембране, и цитоплазматического транскрипционного регулятора. После взаимодействия внеклеточного эффектора с сенсором (NodV) происходит активация регулятора (NodW) посредством фосфорилирования (Stock et al., 1989; Gottfert et al., 1990a; Parkinson, 1993). Система может активировать гены нодуляции даже в отсутствие NodD (Sanjuan et al., 1994). NodV взаимодействует с иными флавоноидами, нежели NodD1, что расширяет возможности клубенькообразования. Белки NodV и NodW играют роль факторов хозяйской специфичности, так как они обеспечивают образование клубеньков на *Vigna* (коровий горох) и *Macroptilium* (сиратро), но не на *Glycine* (соя). Однако, в отсутствие белка NodD эта система обеспечивает также и нодуляцию сои. Таким образом, NodV является дополнительным, по отношению к NodD1, рецептором изофлавонов (Stacey, 1995). Однако неясно, взаимодействует ли белок NodW с *nod*-промотором или с белком NodD. Кроме того, непонятно, почему эта двухкомпонентная система имеется лишь у одного вида ризобий.

У *S. fredii* имеется особая система, участвующая в регуляции *nodJ*, *nodBTUV* и *nodX* (Meinhardt et al., 1993; Bellato et al., 1996). Эти гены, хотя и не имеют в промоторах последовательности *nod*-box, активируются белком NodD и флавоноидами. Хотя механизм активации в этом случае до конца не ясен, показано, что потенциальный репрессор связывается с последовательностью из 23 нуклеотидов, лежащей на расстоянии 188 нуклеотидов выше старта транскрипции *nodX*. Образование этого комплекса зависит от *nodD1* и *nodD2*, а связывающая последовательность гомологична А-элементу (Mao et al., 1994).

VIII. Негативная регуляция генов клубенькообразования

VIII.A. РЕПРЕССОР NOLR

Высокий уровень экспрессии генов нодуляции снижает активность образования клубеньков по крайней мере в некоторых симбиотических системах (Knight et al., 1986), что объясняет строгость контроля генов нодуляции и наличие негативных регуляторных элементов. Одним из них является белок NolR, выявленный у штамма 41 *S. meliloti* (Kondorosi et al., 1989, 1991a). Он необходим для обеспечения нормальных уровней клубенькообразования и синтеза Nod-фактора (Cren et al., 1995). Ген *nolR* является однокопийным, локализован в хромосоме и присутствует у всех штаммов *S. meliloti*. Интересно, что у штамма SU40 и его производных (1021, 2011), у которых транскрипция данного гена происходит на столь же высоком уровне, как и у штамма 41, его функционирование не влияет на образование клубеньков (данные авторов). У штамма 1021 инсерция, нарушающая С-терминальный домен NolR, приводит к инактивации этого белка (Cren et al., 1994).

У *S. meliloti* белок NolR имеет молекулярную массу 13 кДа и содержит ДНК-связывающий мотив “спираль-поворот-спираль” (Kondorosi et al., 1991b). Мутации по этому мотиву нарушают связывание NolR с ДНК, однако С-терминальная часть белка также участвует в связывании (Cren et al., 1995). NolR проявляет сходство с регуляторами транскрипции SmtB, MerR, AsrB, CadC в

отношении общего размера и локализации ДНК-связывающего мотива. Более того, все эти белки являются репрессорами, взаимодействующими с регуляторными участками промоторов $-35...-10$ (Kondorosi et al., 1989; O'Halloran et al., 1989).

У *S. meliloti* белок NolR репрессирует *nodD1* и *nodABCII*, связываясь с перекрывающимся промотором этих генов, а также *nodD2* и оперон *nodMnolFGHInodN*. Этот белок в димерной форме связывается с последовательностью (A/T)TTAG-N(9)-A(T/A), расположенной в 2-12 парах нуклеотидов ниже *nod*-box в промоторах *S. meliloti n1, n4, n6* (рис. 2, 5) (Cren et al., 1995). Белок NolR защищает последовательности $-20...+14$ *nodABCII* и $-26...+1$ *nodD1*, соответственно (Kondorosi et al., 1989). Эти NolR-защищенные районы на 1-2 нуклеотида перекрываются с NodD-защищенными районами штамма 41. Лютеолин, индуцирующий *nod*-гены, подавляет формирование комплексов NolR с ДНК. Присутствие тяжелых металлов также снижает сродство репрессоров типа AsgR к оператору, возможно, благодаря аллостерическим изменениям (O'Halloran et al., 1989). Основываясь на измененной активности образования ДНК-белкового комплекса и характера защиты ДНК в присутствии лютеолина, можно предположить, что этот индуктор усиливает сродство NodD к *nod*-box и тем самым ухудшает связывание NolR с оператором и освобождение сайта связывания для РНК-полимеразы (Kondorosi et al., 1989). Кроме того, NolR способен к репрессии собственного синтеза за счет связывания с промотором. В отличие от большинства генов нодуляции, экспрессия *nolR* происходит активно как у свободноживущих бактерий, так и при симбиозе (Cren et al., 1995).

Негативная регуляция *nod*-генов, опосредованная белком NolR, показана также у штамма TOM *R. leguminosarum* bv. *viceae* и NGR234 *Rhizobium* sp. Последовательности, гомологичные *nolR*, выявлены у *R. leguminosarum* bv. *trifolii* и *S. fredii*. Более того, у этих бактерий, а также и у многих других ризобий последовательности, являющиеся мишенями для NolR, присутствуют в промоторах многих *nod*-генов (рис. 5). Таким образом, хотя белок NolR и не является универсальным для ризобий, по крайней мере у некоторых видов он обеспечивает негативную регуляцию генов, контролирующих образование клубеньков.

VIII.B. БЕЛОК NOLA

Ген *nolA* выявлен только у *Bradyrhizobium* spp. и вовлечен в специфическое образование клубеньков у некоторых растительных генотипов (Sadowsky et al., 1991; Gilette, Elkan, 1996). Первоначально было показано, что он является репрессором генов нодуляции (Dockendorff et al., 1994a). Однако, последующие результаты вошли в противоречие с этой гипотезой, поскольку не было выявлено прямого действия Nola на экспрессию *nodD1* и *nodYABC* (Garcia et al., 1996). С другой стороны, ген *nolA* необходим как для собственной экспрессии, как и для экспрессии *nodD2*. Конститутивная экспрессия *nodD2* подавляет транскрипцию *nod*-генов и поэтому возможно, что Nola посредством NodD2, а также и других белков, осуществляет репрессию генов образования клубеньков. Неожиданным оказалось то, что мутации по гену *nolA* оказывают более сильное влияние на поздние стадии симбиоза, чем на образование клубеньков, снижая количество инфицированных клеток и нарушая развитие бактериоидов в клубеньках вигны.

Прямые доказательства регуляторной функции гена *nolA* до сих пор отсутствуют. Белок Nola, состоящий из 238 аминокислотных остатков и имеющий молекулярную массу 27 кДа, проявляет слабую гомологию с регуляторным белком MerR (Sadowsky et al., 1991). Эта гомология ограничена первыми 70 остатками на N-конце и не затрагивает расположенный в центре ДНК-связывающий мотив "спираль-поворот-спираль" белка MerR и других регуляторных белков семейства ArsR. Таким образом, как размер белка Nola, так и расположение ДНК-связывающего мотива не позволяют говорить о его принадлежности к данному семейству регуляторов. С другой стороны, Nola содержит мотив "спираль-поворот-спираль" между 13 и 32 аминокислотными позициями (Sadowsky et al., 1991). Хотя пока для этого белка не получено прямых доказательств ДНК-связывающей активности, наличие предполагаемого ДНК-связывающего мотива и стимуляция экспрессии *nolA* и *nodD2* говорит о наличии у него регуляторных функций.

<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	<i>nodA</i>	TATAGAAAACCCGGAA	(+)
	<i>nodF</i>	CATAGCAGGGCAGCCG	(-)
	<i>nodM</i>	ATTAGCACGCGCTGGA	(-)
	<i>nodO</i>	GATAAGGGGCACAGGC	(-)
штамм TOM	<i>nodR</i>	ATTAGGAAGATAACAT	+
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>nodA</i>	ATTAGAAAGGCCGAA	(+)
	<i>nodF</i>	CATAGCACAAAACCAG	(-)
<i>S. meliloti</i>	<i>nodA-nodD1*</i> (n1)	ATTAGAGAACCCTGAA	+
	<i>nodF</i> (n2)	GATATGAGCACAAAGCT	-
	<i>nodH</i> (n3)	ATTAAAACGCTAAGCA	-
	<i>nodM</i> (n4)	TTTAGGAGACCCTGAA	+
	<i>nodL</i> (n5)	GATAGGAGACAAGGCG	-
	<i>nodQ-nodD2*</i> (n6)	ATTAGAGAACCCTGAA	+
	<i>syrM</i> (n7)	ATTACAAGAACGTTAG	(+)
	<i>nodR</i>	ATTAGCCGTGATGCAT	+
	<i>nodD3</i>	ATTACACCGGTAGGAA	(+)
<i>S. fredii</i>	<i>nodA</i>	ATTAGAAGATGCTCAC	(+)
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	<i>nodA</i> (n8)	ATTAGAAGATGCTCAC	(+)
	<i>nodZ</i> (n2)	ATTAGGAAGCTCTGAA	(+)
	<i>noeK</i> (n3)	ATTAGTGGATGCGAAT	(+)

КОНСЕНСУС

(A/T) TTAG--N (9) ---A (T/A)

Рисунок 5. Последовательности-мишени белка NodR в промоторах генов нодуляции (Cren et al., 1995). *резервная комплементарная последовательность, (+) — контроль NodR показан, (-) — показано отсутствие контроля NodR; знак в скобках означает наличие лишь предварительных данных.

IX. Другие факторы, регулирующие гены клубенькообразования

Установление симбиоза и формирование азотфиксирующих клубеньков находится под влиянием многих факторов среды. Развитие клубеньков нарушается при низких значениях pH и под действием связанных с этим почвенных факторов (Richardson et al., 1989). Эти нарушения проявляются главным образом на ранних этапах симбиоза — перед началом и во время скручивания корневых волосков. Одной из причин чувствительности может быть замедление роста ризобий в кислой почве, когда удлиняется log-фаза и нарушается индукция *nod*-генов, лектин-связывающая активность и инфекционность. Возможно, что в кислой почве нарушается также экскреция растением флавоноидных индукторов *nod*-генов (Richardson et al., 1988). Более того, накопление этих индукторов в бактериях также является кислочувствительным, что опять-таки может нарушать экспрессию *nod*-генов (Recourt et al., 1989). Чувствительность к кислотности находится под влиянием концентрации Ca^{2+} (Richardson et al., 1988). Повышение этой концентрации может снять ингибирование, вызванное низкой кислотностью. Хотя роль ионов Ca^{2+} остается неясной, можно предположить, что они являются важным элементом пути переноса Nod-сигнала или могут быть вовлечены в стимуляцию синтеза флавоноидов, что усиливает экспрессию *nod*-генов.

Наиболее активно симбиоз бобовых с ризобиями развивается в условиях лимитации по азоту. Повышение концентрации азотных соединений может подавлять синтез фенольных веществ растениями, что, как и снижение кислотности, лимитирует индукцию *nod*-генов и последующее формирование симбиоза (Kapulnik et al., 1987). У *S. meliloti* и *B. japonicum* экспрессия некоторых *nod*-генов контролируется связанным азотом. У *S. meliloti* аммоний регулирует эксп-

реессию *nodABCII* и *nodD3*, но не *nodD1* посредством общей системы регуляции азотного обмена (*ntr*) и хромосомного гена *ntrR* (Dusha et al., 1989). Азотный статус влияет на Ntr-систему, и возможно, что сигнал переносится на *syrM* и *nodD3* посредством регуляторных белков NtrA и NtrC. Второй из них связывается с промотором *nodD3* и участок ДНК, защищаемый NtrC, соответствует предполагаемому сайту связывания (Dusha, Dixon, 1994). Репрессия генов нодуляции высокими концентрациями аммония обеспечивается белком NtrR (Dusha, Kondorosi, 1993). Для максимальной экспрессии генов *nodABC* *S. meliloti* в штамме NGR234 *Rhizobium* sp. также необходим ген *ntrA* (Stanley et al., 1989). У *B. japonicum* аммоний репрессирует гены *nodD1* и *nodYABC* независимо от NtrC и NifA (Wang, Stacey, 1990). Однако, этот эффект не является общим для всех ризобий: у *R. leguminosarum* bv. *viciae* экспрессия генов *nodD* и *nodABC* не зависит от связанного азота (Baev, Kondorosi, 1992).

Х. Экспрессия генов клубенькообразования на поздних стадиях симбиоза

Экспрессия *nod*-генов регистрируется *in planta* в инфекционных нитях, в корневых волосках и в инфекционной зоне клубенька, но затем резко снижается при дифференцировке бактериоидов в центральной зоне и полностью исчезает в зоне старения клубенька (Sharma, Signer, 1990; Schlaman et al., 1991; Cren et al., 1995; Freiberg et al., 1997). У *R. leguminosarum* bv. *viciae* экспрессия гена *nodD* резко подавлялась в бактериоидах, возможно, благодаря действию не идентифицированного репрессора (Schlaman et al., 1991, 1992a). В то же время, экспрессия гена *syrM* *S. meliloti* усиливается в бактериоидах (Sharma, Signer, 1990).

Механизм репрессии *nod*-генов *in planta* неясен. Причиной ее не может считаться недостаток белка NodD или флавоноидных индукторов (Schlaman et al., 1991). Анализ подвижности в геле промоторов *nod*-генов, обработанных экстрактами бактериоидов *R. leguminosarum* bv. *viciae* показал, что белок NodD в бактериоидах изменен, что может ухудшать его связывание с *nod*-box (Schlaman et al., 1992a). Хотя в бактериоидах и выявлен высокий уровень белка NodR, это вряд ли является причиной репрессии *nod*-генов (Cren et al., 1995). Показано, что причиной изменения активности *nod*-генов в бактериоидах может быть катаболизм флавоноидов (Rao, Cooper, 1995). Первичным источником углерода для ризобий *in planta* являются органические кислоты, которые могут быть вовлечены и в регуляцию *nod*-генов при симбиозе. Показано, что некоторые дикарбоновые кислоты (ацетат, фумарат, L-малат, сукцинат) в концентрации 1 мМ подавляют экспрессию генов *nodD1* и *nodYABC* у *B. japonicum* (Yuen, Stacey, 1996). Когда ацетат и L-малат, являющиеся основными источниками азота для бактериоидов, добавлялись вместе, степень ингибирования достигала 91%. Таким образом, эти соединения могут, по крайней мере частично, обуславливать снижение активности *nod*-генов в бактериоидах.

Функции белков NodD и SyrM на поздних стадиях симбиоза неясны. У штамма NGR234 *Rhizobium* sp. найдены NodD-регулируемые промоторы, которые активируются на поздних стадиях инфекции, что говорит о необходимости работы флавоноид-зависимых генов в клубеньках (Freiberg et al., 1997). Некоторые наблюдения говорят о важности белка NodD для азотфиксации. (1) Бактерии, содержащие гибридный ген *FITA-nodD* (*nodD604*), обеспечивают нормальное образование клубеньков, хотя уровень азотфиксации повышен по сравнению со штаммом дикого типа (Spaink et al., 1989a). Однако это не связано с более продолжительной экспрессией *nodD*. (2) Получен *nodD*-мутант, проявляющий нормальную кинетику образования клубеньков, однако они не фиксируют азот (Burn et al., 1987). (3) Ген *syrM* *S. meliloti* является единственной аллелью *nodD*, которая активно экспрессируется в азотфиксирующих бактериоидах и с низкой интенсивностью экспрессируется в свободноживущих бактериях, тогда как экспрессия других *nodD*-аллелей носит противоположный характер (Sharma, Signer, 1990). (4) Общая система для регуляции экспрессии генов азотом (Ntr) контролирует транскрипцию гена *nodD3* *S. meliloti* (Kondorosi et al., 1991a; Dusha, Kondorosi, 1993; Dusha, Dixon, 1994). (5) Экспрессия генов *nodD* у различных видов ризобий регулируется аммонием (Dusha et al., 1989; Stanley et al., 1989; Wang, Stacey, 1990).

XI. Выводы и перспективы

Оптимизация процесса образования клубеньков возможна лишь при тонкой регуляции генов, контролирующих этот процесс. Это связано с тем, что данные гены контролируют синтез Nod-факторов, структура и концентрация которых определяет образование симбиотических структур (главы 20, 21). Детальное изучение регуляции *nod*-генов в основном проводилось у *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *S. meliloti* и *B. japonicum*, у которых механизмы этой регуляции существенно различаются (рис. 6). Так, у свободноживущих бактерий активация генов, содержащих в промоторе *nod*-box, опосредована белком NodD, который может присутствовать в одной копии (*R. leguminosarum* bv. *viciae*) или в нескольких копиях (*S. meliloti*, *B. japonicum*), а также растительными флавоноидами. Различные варианты NodD по-разному реагируют на растительные сигналы, а также различаются по сродству к *nod*-box. Поэтому количество и структура Nod-факторов может варьировать в широких пределах, что обеспечивает оптимальный для каждого вида бобовых уровень клубенькообразования. Кроме этого у *B. japonicum* выявлена дополнительная система активации *nod*-генов (NodV/W), которая позволяет бактериям расширять круг хозяев. Важно отметить, что активация NodD необходима, но не достаточна для успешного образования клубеньков. Это иллюстрируют данные по активации гена NodD у штамма NGR234 *Rhizobium* sp. экстрактами растений, не образующих клубеньков - пшеницы, кукурузы, риса (Bender et al., 1988).

Уровень продукции Nod-фактора должен соответствовать потребностям растения-хозяина, и это достигается благодаря наличию систем негативной регуляции *nod*-генов. Она может происходить за счет нескольких механизмов: (1) сильной негативной авторегуляции белка NodD (*R. leguminosarum* bv. *viciae*), (2) действия репрессора NodR, подавляющего активность гена *nodD*, а также "общих" генов клубенькообразования (*S. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *viciae*, штамм TOM), (3) непрямого негативного контроля "общих" *nod*-генов (NodA посредством NodD2, который действует как репрессор генов нодуляции у *B. japonicum*). Помимо этих хорошо изученных трансдействующих факторов, другие белки (C1 и C2 у *R. leguminosarum* bv. *viciae*, C, CI, CII у *S. meliloti*, см. рис. 6) взаимодействуют с промоторами генов клубенькообразования. Однако для большинства этих белков не выявлено участия в контроле транскрипции. Помимо регуляторных белков, существенную роль в экспрессии *nod*-генов играют факторы среды. В бактериоидах гены нодуляции обычно не экспрессируются, однако механизм подавления их активности неясен. Возможно, что в бактериоидах *R. leguminosarum* bv. *viciae* синтезируются белки, подавляющие экспрессию гена *nodD*.

Тонкий механизм индукции *nod*-генов до сих пор окончательно не выяснен, хотя многие из участвующих в этом молекул изучены детально. Наиболее существенным является отсутствие прямых доказательств в пользу взаимодействия белка NodD с флавоноидами. Неясно также, выполняет ли NodD функцию активатора транскрипции, находясь в составе внутренней мембраны, или он после взаимодействия с флавоноидами переходит в цитоплазму (Kondorosi et al., 1989; Schlaman, 1992). Последнее подтверждается тем, что шаперон GroEL активно взаимодействует с NodD, что может способствовать его контакту с другими компонентами аппарата транскрипции.

Перенос сигналов у бактерий часто опосредован двухкомпонентными системами, состоящими из сенсорного и регуляторного белков. Однако, накапливается все больше данных о важной роли в этом и однокомпонентных регуляторных систем, таких как LysR-подобные белки. Ризобийальные NodD-белки являются наиболее изученными транскрипционными регуляторами этой группы и могут рассматриваться как модель для изучения однокомпонентных регуляторных систем.

XII. Благодарности

Выражаем признательность всем коллегам, предоставившим неопубликованные данные, а также помогавшим в составлении генетических карт: B. Broughton, B. Fisher, M. Gottfert, M. Holsters, D. Kafetzopoulos, E. Kiss, H. Krishnan, K. Lindstrom, P. Mergaert, D. Paelinck, C. Quinto, M. Schell, G. Stacey, J. Vanderleyden, K. Vlassak.

XIII. Литература

- Appelbaum E.R., Thompson D.V., Idler K., Chartrain N. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 12-20.
- Ardourel M., Lortet G., Maillet F., Roche P., Truchet G., Prome J.-C., Rosenberg C. (1995) *Mol. Microbiol.* V. 17, p. 687-699.
- Bachem C.W.B., Kondorosi E., Banfalvi Z., Horvath B., Kondorosi A., Schell J. (1985) *Mol. Gen. Genet.* V. 199, p. 271-278.
- Baev N., Endre G., Petrovics G., Banfalvi Z., Kondorosi A. (1991) *Mol. Gen. Genet.* V. 228, p. 113-124.
- Baev N., Kondorosi A. (1992) *Plant Mol. Biol.* V. 18, p. 643-846.
- Baev N., Schultze M., Barlier I., Cam Ha D., Virelizier H., Kondorosi E., Kondorosi A. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 7555-7565.
- Balatti P.A., Kovacs L.G., Krishnan H.B., Pueppke S.G. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 693-699.
- Banfalvi Z., Sakanyan V., Konec C., Kisc A., Dusha I., Kondorosi A. (1981) *Mol. Gen. Genet.* V. 184, p. 318-325.
- Barlier I. (1995) PhD thesis. Univers. Paris VI, France.
- Barnett M.J., Long S.R. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 3695-3700.
- Barnett M.J., Rushing B.G., Fisher R.F., Long S.R. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 1782-1787.
- Bassam B.J., Djordjevic M.A., Redmond J.W., Batley M., Rolfe B.G. (1988) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 1, p. 161-168.
- Bellato C.M., Balatti P.A., Pueppke S.G., Krishnan H.B. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 457-463.
- Bellato C., Krishnan H.B., Cubo T., Temprano F., Pueppke S.G. (1997) *Microbiology.* V. 143, p. 1381-1388.
- Bender G.L., Nayudu M., Le Strange K.K., Rolfe B.G. (1988) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 1, p. 259-266.
- Beringer J.E., Beynon J.L., Buchanon-Wallaston A.V., Johnston A.W.B. (1978) *Nature.* V. 276, p. 633-634.
- Beynon J.L., Beringer J.E., Johnston A.W.B. (1980) *J. Gen. Microbiol.* V. 10, p. 421-429.
- Bongue-Bartelsman M., Phillips D.A. (1995) *Plant Physiol. Biochem.* V. 33, p. 539-546.
- Broughton W.J., Krause A., Lewin A., Perret X., Price N.P.J. (1991) In: H. Hennecke, D.P.S. Verma (eds.). *Adv. Mol. Genet. Plant-Microbe Interact.* V.1, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands, p. 162-167.
- Buchanan-Wollaston A.V. (1979) *J. Gen. Microbiol.* V. 112, p. 135-142.
- Burn J., Rossen L., Johnston A.W.B. (1987) *Genes & Devel.* V. 1, p. 456-464.
- Burn J.E., Hamilton W.D., Wootton J.C., Johnston A.W.B. (1989) *Mol. Microbiol.* V. 3, p. 1567-1577.
- Canter-Cremers H.C.J., Spaink H.P., Wijffes A.H.M., Pees E., Wijffelman C.A., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1989) *Plant Mol. Biol.* V. 13, p. 163-174.
- Cardenas L., Dominguez J., Santana O., Quinto C. (1996) *Gene.* V. 173, p. 183-187.
- Cervantes E., Sharma S.B., Maillet F., Vasse J., Truchet G., Rosenberg C. (1989) *Mol. Microbiol.* V. 3, p. 745-755.
- Cloutier J., Laberge S., Castonguay Y., Antoun H. (1996a) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 720-728.
- Cloutier J., Laberge S., Prevost D., Antoun H. (1996b) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 523-531.
- Chun J.Y., Stacey G. (1994) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 248-255.
- Collins-Emmerson J.M., Terzaghi E.A., Scott D.B. (1990) *Nucl. Acids Res.* V. 18, p. 6690-6690.
- Coronado C., Zuanazzi J.A.S., Sallaud C., Quirion J.C., Esnault R., Husson H.P., Kondorosi A., Ratet P. (1995) *Plant Physiol.* V. 108, p. 533-542.
- Cren M. (1994) PhD Thesis, Univ. Paris Sud, France.
- Cren M., Kondorosi A., Kondorosi E. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 518-519.
- Cren M., Kondorosi A., Kondorosi E. (1995) *Mol. Microbiol.* V. 15, p. 733-747.
- Cunningham S., Kollmeyer W.D., Stacey G. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 57, p. 1886-1892.
- Dakora F.D., Joseph C.M., Phillips D.A. (1993a) *Plant Physiol.* V. 101, p. 819-824.
- Dakora F.D., Joseph C.M., Phillips D.A. (1993b) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 6, p. 665-668.
- D'Arcy-Lameta A. (1986) *Plant and Soil.* V. 92, p. 113-123.
- Davis E.O., Johnston A.W.B. (1990) *Mol. Microbiol.* V. 4, p. 933-941.
- De Maagd R.A., Wijffes A.H.M., Spaink H.P., Ruiz-Sainz J.E., Wijffelman C.A., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 6764-6770.
- Debelle F., Sharma S.B. (1986) *Nucl. Acids Res.* V. 14, p. 7453-7472.
- Deshmane A., Stacey G. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 3324-3330.
- Ditta G., Stanfield S., Corbin D., Helinski D.R. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 77, p. 7347-7351.
- Djordjevic M.A., Mathesius U., Arioli T., Weinman J.J., Gartner E. (1997) *Austral. J. Plant Physiol.* V. 24, p. 119-132.
- Djordjevic M.A., Redmond J.W., Batley M., Rolfe B.G. (1987) *EMBO J.* V. 6, p. 1173-1179.
- Djordjevic M.A., Schofield P.P., Ridge R.W., Morrison N.A., Bassam B.J., Planzinski J., Watson J.M., Rolfe B.G. (1985) *Plant Mol. Biol.* V. 4, p. 147-160.
- Djordjevic M.A., Zurkowski W., Shine J., Rolfe B.G. (1983) *J. Bacteriol.* V. 156, p. 1035-1045.
- Dober R.C., Brei B.T., Triplett E.W. (1994) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 564-572.
- Dockendorff T.C., Sanjuan J., Grob P., Stacey G. (1994a) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 596-602.
- Dockendorff T.C., Sharma A., Stacey G. (1994b) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 173-180.
- Downie J.A., Hombrecher G., Ma Q.-S., Knight C.D., Wells B., Johnston A.W.B. (1983) *Mol. Gen. Genet.* V. 190, p. 359-365.
- Downie J.A., Knight C.D., Johnston A.W.B., Rossen L. (1985) *Mol. Gen. Genet.* V. 198, p. 255-262.
- Dusha I., Bakos A., Kondorosi A., de Bruijn F., Schell J. (1989) *Mol. Gen. Genet.* V. 219, p. 89-96.

- Dusha I., Dixon R.A. (1994) In: G.B. Kiss, G. Endre (eds.), Proc. 1-st Europ. Nitrogen Fixation Conf. Officina P., Szeged, Hungary, p. 307.
- Dusha I., Kondorosi A. (1993) *Mol. Gen. Genet.* V. 240, p. 435-444.
- Economou A., Hamilton W.D.O., Johnston A.W.B., Downie J.A. (1990) *EMBO J.* V. 9, p. 349-354.
- Economou A., Hawkins F.K.I., Downie J.A., Johnston A.W.B. (1989) *Mol. Microbiol.* V. 3, p. 87-93.
- Egelhoff T.T., Fisher R.F., Jacobs T.W., Mulligan J.T., Long S.R. (1985) *DNA.* V. 4, p. 241-248.
- Evans I.J., Downie J.A. (1986) *Gene.* V. 43, p. 95-101.
- Firmin J.L., Wilson K.E., Rossen L., Johnston A.W.B. (1986) *Nature.* V. 324, p. 90-92.
- Fisher R.F., Brierley H.L., Mulligan J.T., Long S.R. (1987a) *J. Biol. Chem.* V. 262, p. 6849-6855.
- Fisher R.F., Egelhoff T., Mulligan J.T., Long S.R. (1988) *Genes & Devel.* V. 2, p. 282-293.
- Fisher R.F., Long S.R. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 5492-5502.
- Fisher R.F., Long S.R. (1993) *J. Mol. Biol.* V. 233, p. 336-348.
- Fisher R.F., Swanson J.A., Mulligan J.T., Long S.R. (1987b) *Genetics.* V. 117, p. 191-201.
- Fisher R.F., Tu J.K., Long S.R. (1985) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 49, p. 1432-1435.
- Folch-Mallol J.L., Marroqui S., Sousa C., Manyani H., Lopez-Lara I.M., van der Drift K.M.G.M., Haverkamp J., Quinto C., Gil-Serrano A., Thomas-Oates J., Spaink H.P., Megias M. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 151-163.
- Freiberg C., Fellay R., Bairoch A., Broughton W.J., Rosenthal A., Perret X. (1997) *Nature.* V. 387, p. 394-401.
- Friedman A.M., Long S.R., Brown S.E., Buikema W.J., Ausubel F.M. (1982) *Gene.* V. 18, p. 289-296.
- Gagnon H., Ibrahim R.K. (1998) *Mol. Plant-Microbe Interact.* (In press).
- Garcia M., Dunlap J., Loh J., Stacey G. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 625-635.
- Gcelen D., Mergaert P., Geremia R.A., Goormachtig S., Van Montagu M., Holsters M. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 9, p. 145-154.
- Gerhold D., Stacey G., Kondorosi A. (1989) *Plant Mol. Biol.* V. 12, p. 181-188.
- Gillette W.K., Elkan G.H. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 2757-2766.
- Girard M.L., Flores M., Brom S., Romero D., Palacios R., Davila G. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 2411-2419.
- Goethals K., Gao M., Tomekpe K., Van Montagu M., Holsters M. (1989) *Mol. Gen. Genet.* V. 219, p. 289-298.
- Goethals K., Van den Eede G., Van Montagu M., Holsters M. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 2658-2666.
- Goethals K., Van Montagu M., Holsters M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 89, p. 1646-1650.
- Gottfert M., Grob P., Hennecke H. (1990a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 87, p. 2680-2684.
- Gottfert M., Hitz S., Hennecke H. (1990b) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 3, p. 308-316.
- Gottfert M., Holzhauser D., Bani D., Hennecke H. (1992) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 5, p. 257-265.
- Gottfert M., Horvath B., Kondorosi E., Rodriguez-Quinones F., Kondorosi A. (1986) *J. Mol. Biol.* V. 191, p. 411-420.
- Gottfert M., Lamb J.W., Gasser R., Semenza J., Hennecke H. (1989) *Mol. Gen. Genet.* V. 215, p. 407-415.
- Graham T.L. (1991) *Plant Physiol.* V. 95, p. 594-603.
- Gu J., Balatti P.A., Krishnan H.B., Pueppke S.G. (1997) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 10, p. 138-141.
- Gyorgypal Z., Iyer N., Kondorosi A. (1988) *Mol. Gen. Genet.* V. 212, p. 85-92.
- Gyorgypal Z., Kiss G.B., Kondorosi A. (1991b) *Bioessays.* V. 13, p. 575-581.
- Gyorgypal Z., Kondorosi A. (1991) *Mol. Gen. Genet.* V. 226, p. 337-340.
- Gyorgypal Z., Kondorosi E., Kondorosi A. (1991a) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 4, p. 356-364.
- Harrington R.E. (1992) *Mol. Microbiol.* V. 6, p. 2549-2555.
- Hartwig U.A., Maxwell C.A., Joseph C.M., Phillips D.A. (1989) *Plant Physiol.* V. 91, p. 1138-1142.
- Hartwig U.A., Maxwell C.A., Joseph C.M., Phillips D.A. (1990a) *Plant Physiol.* V. 92, p. 116-122.
- Hartwig U.A., Maxwell C.A., Joseph C.M., Phillips D.A. (1990b) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 2769-2773.
- Hartwig U.A., Phillips D.A. (1991) *Plant Physiol.* V. 95, p. 804-807.
- Hawes M.C. (1990) *Plant and Soil.* V. 129, p. 19-27.
- Henikoff S., Haughn J.M., Calvo J.M., Wallace J.C. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 85, p. 6602-6606.
- Hong G.-F., Burn J.E., Johnston A.W.B. (1987) *Nucl. Acids Res.* V. 15, p. 9677-9690.
- Honma M.A., Asomaning M., Ausubel F.M. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 901-911.
- Hooykaas P.J.J., Peerbolte R., Regensburg-Tuink A.J.G., de Vries P., Schilperoort R.A. (1982) *Mol. Gen. Genet.* V. 188, p. 12-17.
- Hooykaas P.J.J., van Brussel A.A.N., den Dulk-Ras A., van Slogteren G.M.S., Schilperoort R.A. (1981) *Nature.* V. 291, p. 351-353.
- Horvath B., Bachem C.W.B., Schell J., Kondorosi A. (1987) *EMBO J.* V. 6, p. 841-848.
- Horvath B., Kondorosi E., John M., Schmidt J., Torok I., Gyorgypal Z., Barabas I., Wieneke U., Schell J., Kondorosi A. (1986) *Cell.* V. 46, p. 335-343.
- Huang J., Schell M.A. (1991) *J. Biol. Chem.* V. 266, p. 10830-10838.
- Hungria M., Joseph C.M., Phillips D.A. (1991a) *Plant Physiol.* V. 97, p. 751-758.
- Hungria M., Joseph C.M., Phillips D.A. (1991b) *Plant Physiol.* V. 97, p. 759-764.
- Hungria M., Johnston A.W.B., Phillips D.A. (1992) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 5, p. 199-203.
- Innes R.W., Kuempel P.L., Plazinski J., Canter-Cremers H., Rolfe B.G., Djordjevic M.A. (1985) *Mol. Gen. Genet.* V. 201, p. 426-432.
- Jacobs M., Rubery P.H. (1988) *Science.* V. 241, p. 346-349.
- Jacobs T.W., Egelhoff T.T., Long S.R. (1985) *J. Bacteriol.* V. 162, p. 469-476.
- Johnston A.W.B., Beringer J.E. (1977) *Nature.* V. 267, p. 611-613.

- Johnston A.W.B., Beynon J.L., Buchanan-Wallaston A.V., Setchell S.M., Hirsch P.R., Beringer J.E. (1978) *Nature*. V. 276, p. 634-636.
- Jones G.P., Naidu B.P., Starr R.K., Paleg L.G. (1986) *Austral. J. Plant Physiol.* V. 13, p. 649-658.
- Kalinowski G., Long S.R. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 869-873.
- Kape R., Parniske M., Werner D. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 57, p. 316-319.
- Kape R., Wex K., Parniske M., Gorge E., Wetzel A., Werner D. (1992) *J. Plant Physiol.* V. 141, p. 54-60.
- Kapulnik Y., Joseph C.M., Phillips D.A. (1987) *Plant Physiol.* V. 84, p. 1193-1196.
- Knight C.D., Rossen L., Robertson J.G., Wells B., Downie J.A. (1986) *J. Bacteriol.* V. 166, p. 552-558.
- Kondorosi A., Kondorosi E., Pankhurst C.E., Broughton W.J., Banfalvi Z. (1982) *Mol. Gen. Genet.* V. 188, p. 433-439.
- Kondorosi E., Banfalvi Z., Kondorosi A. (1984) *Mol. Gen. Genet.* V. 193, p. 445-452.
- Kondorosi E., Buire M., Cren M., Iyer N., Hoffmann B., Kondorosi A. (1991a) *Mol. Microbiol.* V. 5, p. 3035-3048.
- Kondorosi E., Gyuris J., Schmidt J., John M., Duda E., Hoffmann B., Schell J., Kondorosi A. (1989) *EMBO J.* V. 8, p. 1331-1340.
- Kondorosi E., Pierre M., Cren M., Haumann U., Buire M., Hoffmann B., Schell J., Kondorosi A. (1991b) *J. Mol. Biol.* V. 222, p. 885-896.
- Kosslak R.M., Bookland R., Barkei J., Paaren H.E., Appelbaum E.R. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 84, p. 7428-7432.
- Kosslak R.M., Joshi R.S., Bowen B.A., Paaren H.E., Appelbaum E.R. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 56, p. 1333-1341.
- Kovacs L.G., Balatti P.A., Krishnan H.B., Pueppke S.G. (1995) *Mol. Microbiol.* V. 17, p. 923-933.
- Krishnan H.B., Lewin A., Fellay R., Broughton W.J., Pueppke S.G. (1992) *Mol. Microbiol.* V. 6, p. 3321-3330.
- Krishnan H.B., Pueppke S.G. (1991a) *Mol. Microbiol.* V. 5, p. 737-745.
- Krishnan H.B., Pueppke S.G. (1991b) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 4, p. 521-529.
- Lawson C.G.R., Rolfe B.G., Djordjevic M.A. (1996) *Austral. J. Plant Physiol.* V. 23, p. 93-101.
- Lewin A., Cervantes E., Chee-Hoong W., Broughton W.J. (1990) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 3, p. 317-326.
- Le Strange K.K., Bender G.L., Djordjevic M.A., Rolfe B.G., Redmond J.W. (1990) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 3, p. 214-220.
- Leon-Barrios M., Dakora F.D., Joseph C.M., Phillips D.A. (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 59, p. 636-639.
- Lewis-Henderson W.R., Djordjevic M.A. (1991) *Plant Mol. Biol.* V. 16, p. 515-526.
- Lindstrom K., Paulin L., Roos C., Suominen L. (1995) In: I. Tikhonovich et al. (eds.). *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*. Proc. 10-th Intern. Cong. Nitrogen Fixation. St.-Petersburg, Russia, p. 365-370.
- Lugtenberg B.J.J. (ed.) (1986) *Recognition in Microbe-Plant Symbiotic and Pathogenic Interactions*, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Luka S., Sanjuan J., Carlson R.W., Stacey G. (1993) *J. Biol. Chem.* V. 268, p. 27053-27059.
- Maillet F., DeBelle F., Denarie J. (1990) *Mol. Microbiol.* V. 4, p. 1975-1984.
- Mao C., Downie J.A., Hong G. (1994) *Gene*. V. 144, p. 87-90.
- Masiot G., Lavaud C., Guillaume D., Le Men-Olivier L. (1988) *J. Agric. Food Chem.* V. 36, p. 902-909.
- Mathesius U., Sehlman H.R.M., Meijer D., Lugtenberg B.J.J., Spaink H.P., Weinman J.J., Roddam L.F., Sautter C., Rolfe B.G., Djordjevic M.A. (1996) In: G. Stacey et al. (eds.) *Biol. Plant-Microbe Interact. Int. Soc. Mol. Plant-Microbe Interact.*, St. Paul, Mn, USA, p. 353-358.
- Maxwell C.A., Hartwig U.A., Joseph C.M., Phillips D.A. (1989) *Plant Physiol.* V. 91, p. 842-847.
- Maxwell C.A., Phillips D.A. (1990) *Plant Physiol.* V. 93, p. 1552-1558.
- Melver J., Djordjevic M.A., Weinman J.J., Bender G.L., Rolfe B.G. (1989) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 2, p. 97-106.
- Melver J., Djordjevic M.A., Weinman J.J., Rolfe B.G. (1993) *Protoplasma*. V. 172, p. 166-179.
- Meade H.M., Long S.R., Ruvkun G.B., Brown S.E., Ausubel F.M. (1982) *J. Bacteriol.* V. 149, p. 114-122.
- Meinhardt L.W., Krishnan H.B., Balatti P.A., Pueppke S.G. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 9, p. 17-29.
- Mergaert P., D'Haese W., Fernandez-Lopez M., Geelen D., Goethals K., Prone J.-C., Van Montagu M., Holsters M. (1996) *Mol. Microbiol.* V. 21, p. 409-419.
- Miller J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA, p. 352-355.
- Mulligan J.T., Long S.R. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 82, p. 6609-6613.
- Mulligan J.T., Long S.R. (1989) *Genetics*. V. 122, p. 7-18.
- Nieuwkoop A.J., Banfalvi Z., Deshmene N., Gerhold D., Schell M.G., Sirotkin K.M., Stacey G. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 2631-2638.
- Ogawa J., Long S.R. (1995) *Genes & Devel.* V. 9, p. 719-729.
- O'Halloran T.V., Frantz B., Shin M.K., Ralston D.M., Wright J.G. (1989) *Cell*. V. 56, p. 119-129.
- Oleszek W., Price K.R., Colquhoun I.J., Jurzysta M., Ploszynski M., Fenwick G.R. (1990) *J. Agric. Food Chem.* V. 38, p. 1810-1817.
- Parkinson J.S. (1993) *Cell*. V. 73, p. 857-871.
- Pees E., Wijffelman C.A., Mulders I., van Brussel A.A.N., Lugtenberg B.J.J. (1986) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 33, p. 165-171.
- Perret X., Broughton W.J., Brenner S. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 88, p. 1923-1927.
- Peters N.K., Frost J.W., Long S.R. (1986) *Science*. V. 233, p. 977-980.
- Peters N.K., Long S.R. (1988) *Plant Physiol.* V. 88, p. 396-400.
- Phillips D.A. (1992) In: H.A. Stafford, R.K. Ibrahim (eds.). *Phenolic Metabolism in Plants*. Plenum Press, NY, USA, p. 201-231.

- Phillips D.A., Dakora F.D., Sande E., Joseph C.M., Zon J. (1994) *Plant and Soil*. V. 161, p. 69-80.
- Phillips D.A., Joseph C.M., Maxwell C.A. (1992) *Plant Physiol.* V. 99, p. 1526-1531.
- Phillips D.A., Wery J., Joseph C.M., Jones A.D., Teuber L.R. (1995) *Crop Sci.* V. 35, p. 805-808.
- Plazenet C., Refregier G., Demont N., Truchet G., Rosenberg C. (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 133, p. 285-291.
- Putnoky P., Kondorosi A. (1986) *J. Bacteriol.* V. 167, p. 881-887.
- Rao A.S. (1990) *Bot. Rev.* V. 56, p. 1-84.
- Rao J.R., Cooper J.E. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 855-862.
- Rasanen L.A., Heikkila-Kallio U., Suominen L., Lipsanen P., Lindstrom K. (1991) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 4, p. 535-544.
- Recourt K., Schripsema J., Kijne J.W., van Brussel A.A.N., Lugtenberg B.J.J. (1991) *Plant Mol. Biol.* V. 16, p. 841-852.
- Recourt K., van Brussel A.A.N., Driessen A.H.M., Lugtenberg B.J.J. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 4370-4377.
- Redmond J.W., Batley M., Djordjevic M.A., Innes R.W., Kuempel P.L., Rolfe B.G. (1986) *Nature*. V. 323, p. 632-635.
- Relic B., Perret X., Estrada-Garcia M.T., Kopcinska J., Golinowski W., Krishnan H.B., Pueppke S.G., Broughton W.J. (1994) *Mol. Microbiol.* V. 13, p. 171-178.
- Richardson A.E., Djordjevic M.A., Rolfe B.G., Simpson R.J. (1988) *Plant and Soil*. V. 109, p. 37-47.
- Richardson A.E., Djordjevic M.A., Rolfe B.G., Simpson R.J. (1989) *Austral. J. Plant Physiol.* V. 16, p. 117-129.
- Rivilla R., Downie J.A. (1994) *Gene*. V. 144, p. 87-91.
- Rodriguez-Quinones F., Fernandez-Burriel M., Banfalvi Z., Megias M., Kondorosi A. (1989) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 2, p. 75-83.
- Rolfe B.G. (1988) *Biofactors*. V. 1, p. 3-10.
- Rossen L., Johnston A.W.B., Downie J.A. (1984) *Nucl. Acids Res.* V. 12, p. 9497-9508.
- Rossen L., Shearman C.A., Johnston A.W.B., Downie J.A. (1985) *EMBO J.* V. 4, p. 3369-3373.
- Rostas K., Kondorosi E., Horvath B., Simoncsits A., Kondorosi A. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 83, p. 1757-1761.
- Rushing B.G., Yelton M.M., Long S.R. (1991) *Nucl. Acids Res.* V. 19, p. 921-927.
- Russell P., Schell M., Neselson K., Halverson L.J., Sirotkin K., Stacey G. (1985) *J. Bacteriol.* V. 164, p. 1301-1308.
- Sadowsky M.J., Cregan P.B., Gottfert M., Sharma A., Gerhold D., Rodriguez-Quinones F., Keyser H.H., Hennecke H., Stacey G. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 88, p. 637-641.
- Sanjuan J., Grob P., Gottfert M., Hennecke H., Stacey G. (1994) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 364-369.
- Schell M.A. (1993) *Annu. Rev. Microbiol.* V. 47, p. 597-626.
- Schlaman H.R.M. (1992) PhD thesis. Leiden University, The Netherlands.
- Schlaman H.R.M., Horvath B., Vijgenboom E., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 4277-4287.
- Schlaman H.R.M., Lugtenberg B.J.J., Okker R.J.H. (1992a) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 6109-6116.
- Schlaman H.R.M., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1992b) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 5177-5182.
- Schlaman H.R.M., Spaink H.P., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 4686-4693.
- Schmidt P.E., Broughton W.J., Werner D. (1994) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 384-390.
- Schofield P.P., Ridge R.W., Rolfe B.G., Shine J., Watson J.M. (1984) *Plant Mol. Biol.* V. 3, p. 3-11.
- Schofield P.R., Watson J.M. (1986) *Nucl. Acids Res.* V. 14, p. 2891-2905.
- Schwedock J., Long S.R. (1989) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 2, p. 181-194.
- Scott D.B., Young C.A., Collins-Emmerson J.M., Terzaghi E.A., Rockman E.S., Lewis P.E., Pankhurst C.E. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 187-197.
- Scott K.F. (1986) *Nucl. Acids Res.* V. 14, p. 2905-2910.
- Sharma S.B., Signer E.R. (1990) *Genes & Devel.* V. 4, p. 344-356.
- Shearman C.A., Rossen L., Johnston A.W.B., Downie J.A. (1986) *EMBO J.* V. 5, p. 647-652.
- Smit G., Puvanesarajah V., Carlson R.W., Barbour W.M., Stacey G. (1992) *J. Biol. Chem.* V. 267, p. 310-318.
- Sousa C., Folch J.L., Boloix P., Megias M., Nava N., Quinto C. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 9, p. 1157-1168.
- Spaink H.P., Okker R.J.H., Wijffelman C.A., Pees E., Lugtenberg B.J.J. (1987a) *Plant Mol. Biol.* V. 9, p. 27-39.
- Spaink H.P., Okker R.J.H., Wijffelman C.A., Tak T., Goosen-de Roo L., Pees E., van Brussel A.A.N., Lugtenberg B.J.J. (1989a) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 4045-4053.
- Spaink H.P., Sheeley D.M., van Brussel A.A.N., Glushka J., York W.S., Tak T., Geiger O., Kennedy E.P., Reinhold V.N., Lugtenberg B.J.J. (1991) *Nature*. V. 354, p. 125-130.
- Spaink H.P., Weinman J., Djordjevic M.A., Wijffelman C.A., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1989b) *EMBO J.* V. 8, p. 2811-2818.
- Spaink H.P., Wijffelman C.A., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1989c) *Plant Mol. Biol.* V. 12, p. 59-73.
- Spaink H.P., Wijffelman C.A., Pees E., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1987b) *Nature*. V. 328, p. 337-340.
- Stacey G. (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 127, p. 1-9.
- Stacey G., Luka S., Sanjuan J., Banfalvi Z., Nieuwkoop A.J., Chun J.Y., Forsberg L.S., Carlson R. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 620-633.
- Stafford H.A. (1990) *Flavonoid Metabolism*, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Stanley J., van Slooten J., Dowling D.N., Finan T., Broughton W.J. (1989) *Mol. Gen. Genet.* V. 217, p. 528-532.
- Stock J.B., Ninfa A.J., Stock A.M. (1989) *Microbiol. Rev.* V. 53, p. 450-490.
- Surin B.P., Downie J.A. (1988) *Mol. Microbiol.* V. 2, p. 173-183.
- Surin B.P., Watson J.M., Hamilton W.D.O., Economou A., Downie J.A. (1990) *Mol. Microbiol.* V. 4, p. 245-252.

- Swanson J.A., Mulligan J.T., Long S.R. (1993) *Genetics*. V. 134, p. 435-444.
- Torok I., Kondorosi E., Stepkowski T., Posfai J., Kondorosi A. (1984) *Nucl. Acids Res.* V. 12, p. 9509-9524.
- Van Brussel A.A.N., Tak T., Pees E., Wijffelman C.A. (1982) *Plant Sci. Lett.* V. 27, p. 317-325.
- Van Brussel A.A.N., Recourt K., Pees E., Spaink H.P., Tak T., Wijffelman C.A., Kijne J.W., Lugtenberg B.J.J. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 5394-5401.
- Van Rhijn P. (1994) PhD thesis. KU Leuven, Belgium.
- Van Rhijn P.J.S., Feys B., Verreth C., Vanderleyden J. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 438-447.
- Van Rhijn P., Luyten E., Vlassak K., Vanderleyden J. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 74-77.
- Van Veen R.J.M., den Dulk-Ras H., Bisseling T., Schilperoort R.A., Hooykaas P.J.J. (1988) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 1, p. 231-234.
- Vargas C., Martinez L.J., Megias M., Quinto C. (1990) *Mol. Microbiol.* V. 4, p. 1899-1910.
- Vazquez M., Davalos A., de las Penas A., Sanchez F., Quinto C. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 1250-1258.
- Vazquez M., Santana O., Quinto C. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 8, p. 369-377.
- Villalobos M.A., Nava N., Vazquez M., Quinto C. (1994) *Gene*. V. 150, p. 201-202.
- Waelkens F., Voets T., Vlassak K., Vanderleyden J., Van Rhijn P. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 147-154.
- Wang S.-P., Stacey G. (1990) *Mol. Gen. Genet.* V. 223, p. 329-331.
- Wang S.-P., Stacey G. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 3356-3365.
- Wijffelman C.A., Pees E., van Brussel A.A.N., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1985) *Arch. Microbiol.* V. 143, p. 225-232.
- Young C., Collins-Emmerson J.M., Terzaghi E.A., Scott D.B. (1990) *Nucl. Acids Res.* V. 18, p. 6691.
- Yuen J.P., Stacey G. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 424-428.
- Zaat S.A.J., Schripsema J., Wijffelman C.A., van Brussel A.A.N., Lugtenberg B.J.J. (1989) *Plant Mol. Biol.* V. 13, p. 175-188.
- Zaat S.A.J., Wijffelman C.A., Spaink H.P., van Brussel A.A.N., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 198-204.

Функции ризобияльных генов клубенькообразования

Доуни Дж. А.

I.	Введение.....	417
II.	Биосинтез Nod-факторов.....	418
III.	Модификации Nod-факторов, специфичные для разных клубеньковых бактерий.....	422
III.A.	N-связанные специфические модификации (группы R1 и R2).....	422
III.B.	O-связанные модификации концевого нередуцирующего остатка (группа R3).....	424
III.C.	O-связанные заместители редуцирующего глюкозамина.....	424
III.C.1.	6-O-сульфат.....	425
III.C.2.	6-O-ацетил.....	425
III.C.3.	6-O-гликозиды.....	426
III.C.4.	3-O-арабиноза.....	426
III.C.5.	1-O-глицерол.....	426
III.D.	Замещения неконцевого остатка	427
IV.	Секреция Nod-факторов.....	427
V.	Секреция белков.....	428
VI.	Гены с неизвестными функциями.....	429
VII.	Заключительные замечания.....	430
VIII.	Благодарности.....	430
IX.	Литература	431

I. Введение

Образование клубеньков у бобовых растений зависит от высокоспецифичного обмена сигналами между растением и бактериями. Клубеньки обычно индуцируются на корнях, хотя у некоторых водных бобовых они могут формироваться и на стеблях. В данной главе преимущественно рассмотрены ризобияльные гены, вовлеченные в биосинтез и секрецию тех соединений, которые индуцируют формирование клубеньков у бобовых.

У ризобий выявлено уже более 50 генов, вовлеченных в клубенькообразование. Первоначально они были названы *nod*-генами, но поскольку число таких факторов продолжало увеличиваться, стали использовать другие обозначения (*nol*, *noe*). Для удобства термин "*nod*-гены" используется здесь традиционно для обозначения всех генов, за исключением тех случаев, когда речь идет о специфических генах. Указанные *nod*-гены разделяются на различные группы в зависимости от их функции. Регуляторные гены (*nodD*, *nodV*, *nodW*, *nolA*, *nolD*, *nolR*, и *syrM*), как предполагается, вовлечены в контроль активности других *nod*-генов — их роль освещается в главе 19.

Определение того, что является *nod*-генами, не всегда очень строго. Дело в том, что мутации в некоторых *nod*-генах могут оказывать очень слабое влияние (или вообще его не оказывать) на процесс клубенькообразования. Иногда это связано с дублированием функции данных генов. Другое объяснение отсутствия фенотипических изменений в клубенькообразовании у мутантов — это то, что тесты были проведены на неадекватном хозяине или в неадекватных условиях выращивания растений. Полезным может быть определение *nod*-генов как факторов, активность которых индуцируется под контролем различных регуляторных продуктов *nod*-генов. Более того, некоторые *nod*-гены, контролирующие хозяйскую специфичность, были выявлены путем отбора клонов, содер-

жащих участки ДНК, которые расширяли специфичность инокуляции (позволяя формировать клубеньки на растениях, которые в норме данным видом клубеньковых бактерий не инокулировались). Активность таких генов не всегда регулируется тем же путем, который имеет место для типичных *nod*-генов.

Различные *nod*-гены (нерегуляторные) могут быть подразделены на несколько групп в зависимости от участия в контроле: (1) биосинтеза или модификации липохитоолигосахаридных Nod-факторов, (2) секреции Nod-факторов, (3) секреции белков, (4) неизвестных функций. Ясно, что по мере накопления наших знаний гены из группы 4 будут перераспределены по другим группам или сформируют новые группы. В таблице 1 суммированы данные о функциях продуктов различных *nod*-генов. Во многих случаях эти функции определены на основе фенотипов, вызываемых мутациями генов, а также сходства их продуктов с белками, функции которых известны. У генов, для продуктов которых обнаружены гомологи, но нет четких фенотипических доказательств функции, в таблице поставлен знак вопроса.

II. Биосинтез Nod-факторов

Прежде чем описывать специфические Nod-факторы, продуцируемые различными клубеньковыми бактериями, я остановлюсь на биохимическом пути, который является общим для всех клубеньковых бактерий и укажу структуру “минимального” Nod-фактора. Как следует из рисунка 1, Nod-фактор построен из основания, состоящего из β -1,4-связанных *N*-ацетил-глюкозаминовых остатков. Предшественник, необходимый для синтеза олигосахарида, представляет из себя UDP-*N*-ацетил-D-глюкозамин (UDP-GlcNAc), который также служит предшественником для липополисахарида и пептидогликана — компонентов внешней мембраны бактерий (Carlson et al., 1994; Inon de Iannino et al., 1995).

Некоторые штаммы ризобий содержат специфическую для клубеньков глюкозамин-синтазу (кодированную геном *nodM*), которая обеспечивает синтез глюкозамин-6-фосфата, предшественника UDP-GlcNAc (Baev et al., 1991; Marie et al., 1992). Другие ризобии используют в синтезе Nod-фактора глюкозамин-синтазу (DlmS) из числа белков “домашнего хозяйства” бактерии. Считается что данный фермент обладает достаточной активностью для удовлетворения дополнительных потребностей в предшественниках глюкозамина, связанных с синтезом Nod-фактора (Marie et al., 1992, 1994).

Хитиновые олигомеры формируются из UDP-GlcNAc под контролем гена *nodC*, который кодирует β -гликозилтрансферазу (Spaink et al., 1994; Geremia et al., 1994; Mergaert et al., 1995; Kamst et al., 1995; Roche et al., 1996). Существует также интегрированный во внутреннюю мембрану белок, который структурно сходен с некоторыми другими гликозил-трансферазами (Saxena et al., 1995; Barny et al., 1993, 1996), большой каталитический домен которых расположен на цитоплазматической поверхности внутренней мембраны (Barny et al., 1996). Некоторые штаммы производят Nod-фактор с центральной частью, включающей строго определенное число (4 или 5) остатков GlcNAc, тогда как другие ризобии, такие как *R. leguminosarum* bv. *viceae*, производят равные количества тетра- и пентамерных Nod-факторов. Длина цепи определяется белком NodC, который тем самым может влиять на хозяйскую специфичность в зависимости от образуемого Nod-фактора (Roche et al., 1996; Kamst et al., 1997).

Следующей стадией в биосинтезе “минимального” Nod-фактора является присоединение азотсвязанной группы от жирной кислоты к терминальному (нередуцирующему) остатку глюкозамина. Это требует последовательной работы генов NodB и NodA (рис. 1). NodB деацетилирует глюкозамин-овый остаток, оставляя свободную аминогруппу (John et al., 1993), которая затем ацилируется в реакции с участием NodA (Rohrig et al., 1994; Atkinson et al., 1994; Mergaert et al., 1995). Хотя *nodA*-гены являются общими для всех клубеньковых бактерий, ясно, что их NodA-белки могут различаться по тому, какие ацильные группы они преимущественно присоединяют (Ritsema et al., 1996; Debelle et al., 1996). Таким образом, аллельное состояние гена *nodA* может определять некоторую вариабельность структуры Nod-фактора. Различные типы жирных кислот, присутствующие в структуре фактора, часто отражают специфику жирных кислот, входящих в состав бактериальных фосфолипидов (Geiger et al., 1994; Cedergren et al., 1995), хотя у некоторых клубеньковых бактерий формирование специфических ацильных групп жирной кислоты контролируется генами *nodEF*.

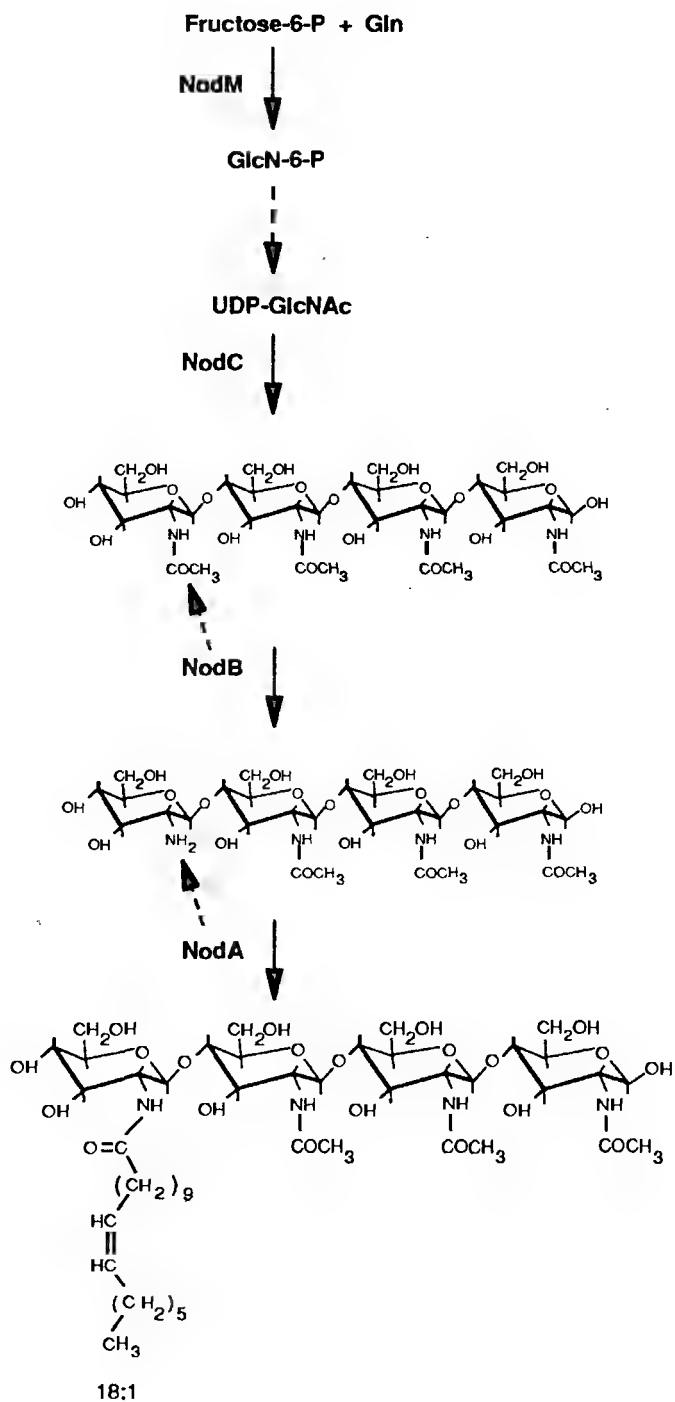


Рисунок 1. Схема биосинтеза “минимального” Nod-фактора

Таблица 1. Функции продуктов *nod*-генов

Ген	Функция генного продукта	Штаммы	Ссылки
<i>nodA</i>	Ацил-трансфераза (рис. 1)	Bce	Atkinson et al., 1994; Rohrig et al., 1994; Mergaert et al., 1995; Ritsma et al., 1996
<i>nodB</i>	N-деацетилаза (рис. 1)	Bce	Spaink et al., 1994; Atkinson et al., 1994; John et al., 1993; Mergaert et al., 1995
<i>nodC</i>	Хитин-синтаза (рис. 1)	Bce	Geremia et al., 1994; Spaink et al., 1994; Inon de Iannino et al., 1995; Bec-Ferte et al., 1996; Kamst et al., 1997; Mergaert et al., 1995; Bamy et al., 1993, 1996
<i>nodD</i>	Регулятор	Bce	Schlaman et al. (глава 19)
<i>nodE</i>	β-кетоацил-синтаза	Sm Rlv Rlt	Spaink et al., 1989, 1991, 1995a; Demont et al., 1993; Bloemberg et al., 1995a; van der Drift et al., 1996
<i>nodF</i>	Переносчик ацильных групп	Sm Rlv Rlt	Demont et al., 1993; Shearman et al., 1986; Geiger et al., 1991; Bibb et al., 1989; Ritsma et al., 1994
<i>nodG</i>	Дегидрогеназа (?)	Sm	Demont et al., 1993
<i>nodH</i>	Сульфотрансфераза	Sm Rt Rn	Roche et al., 1991a; Bourdineaud et al., 1995; Schultze et al., 1995; Ehrhardt et al., 1995; Folch-Mallol et al., 1996
<i>nodI nodJ</i>	Переносчики Nod-факторов	Bce	Evans, Downie, 1986; Vazquez et al., 1993; McKay, Djordjevic et al., 1993; Spaink et al., 1995b; Fernandez-Lopez et al., 1996; Cardenas et al., 1996
<i>nodK</i>	Неизвестна, сходна с <i>nodY</i>	Rn	Scott, 1986
<i>nodL</i>	O-ацетил-трансфераза	Rlv Rlt Sm	Downie, 1989; Baev, Kondorosi, 1992; Ardourel et al., 1995; Bloemberg et al., 1994, 1995b
<i>nodM</i>	Глюкозамин-синтаза (рис. 1)	Sm Rlt Rlv	Baev et al., 1991, 1992; Marie et al., 1992, 1994
<i>nodN</i>	Неизвестна (участие в синтезе Nod-фактора)	Sm Rlv	Surin et al., 1988, 1989; Baev et al., 1991, 1992
<i>nodO</i>	Секретируемый белок, образующий поры	Rlv RspBR816	de Maagd et al., 1989; Economou et al., 1990, 1994; Sutton et al., 1994; van Rhijn et al., 1996
<i>nodP</i>	АТФ-сульфурилаза, киназа	SmRt RspBR816	Schwedock, Long, 1989, 1990, 1992; Schwedock et al., 1994; Folch-Mallol et al., 1996; Laeremans et al., 1996
<i>nodQ</i>			
<i>nodR</i>	Неизвестна		
<i>nodS</i>	N-метил-трансфераза	Rn Rt Ac Bj Sf	Mergaert et al., 1995; Jabbouri et al., 1995; Geelen et al., 1993, 1995; Waelkens et al., 1995
<i>nodT</i>	Белок наружной мембраны, возможно участвует в транспорте Nod-фактора	Rlv Rlt	Surin et al., 1990; Rivilla et al., 1995
<i>nodU</i>	6-O-карбамил-трансфераза	Rn Rt Ac Bj Sf	Jabbouri et al., 1995; Geelen et al., 1995
<i>nodV</i>	2-компонентная регуляторная система	Bj	Schlaman et al. (глава 19)
<i>nodW</i>			
<i>nodX</i>	O-ацетил-трансфераза	Rlv (Tom)	Firmin et al., 1993
<i>nodY</i>	Неизвестна	Bj	Nieuwkoop et al., 1987
<i>nodZ</i>	Фукозил-трансфераза	Ac Rn Re	Stacey et al., 1994; Fellay et al., 1995; Mergaert et al., 1996; Lopez-Lara et al., 1996; Quinto et al., 1997; Quesada-Vincens et al., 1997
<i>nolA</i>	Регулятор, специфичен к сорту растения	Bj	Schlaman et al. (глава 19)
<i>nolB</i>	Секрция (?)	Rn Sf	Balatti et al., 1995; Meinhardt et al., 1993
<i>nolC</i>	Индуктируется при стрессе (DnaI), мутация расширяет спектр хозяев	Sf	Krishnan, Pueppke, 1991a, 1992
<i>nolD</i>	Регулятор (?)		Schlaman et al. (глава 19)
<i>nolE</i>	Периплазматический белок	Rlp	Davis, Johnston, 1990

Ген	Функция генового продукта	Штаммы	Ссылки
<i>nodF nodG</i> <i>nodH nodI</i>	Транспорт (?)	Sm	Bacv et al., 1991, 1992; Saier, 1994
<i>nodH nodJ</i>	Скорость образования клубеньков	Sf	Boundy-Mills et al., 1994
<i>nodK</i>	Синтез ГДФ-фукозы (?)	Ac	Goethals et al., 1992; Mergaert et al., 1996
<i>nodL</i>	О-ацетил-трансфераза	MI	Scott et al., 1996; Freiberg et al., 1997
<i>nodM</i>	Функционирует совместно с <i>nodZ</i> (?)	Bj	Luka et al., 1993
<i>nodN</i>	Неизвестна	Bj	Luka et al., 1993
<i>nodO</i>	2 метил-фукоза (?)	Bj	Luka et al., 1993
<i>nodP</i>	Неизвестна	Rlp	Davis, Johnston, 1990
<i>nodQ</i>	Неизвестна	Sm	Plazanet et al., 1995; Kondorosi (не опубликовано)
<i>nodR</i>	Репрессор <i>nod</i> -генов	Sm Riv Tom	Schlaman et al. (глава 19)
<i>nodS</i>	Неизвестна; сходен с Thil -- ферментом биосинтеза тиамина	Sm	Plazanet et al., 1995
<i>nodT</i>	Система секреции HrpI (?)	Sf Rn	Balatti et al., 1995; Meinhardt et al., 1993; van Gijsem et al., 1995; Kovacs et al., 1995
<i>nodU nodV</i>	Система секреции (?)	Sf Rn	Balatti et al., 1995; Meinhardt et al., 1993; van Gijsem et al., 1995; Kovacs et al., 1995
<i>nodW</i>	Система секреции HrpA (?)	Sf Rn	Balatti et al., 1995; Meinhardt et al., 1993; van Gijsem et al., 1995; Kovacs et al., 1995
<i>nodX</i>	Система секреции (?)	Sf Rn	Balatti et al., 1995; Meinhardt et al., 1993; van Gijsem et al., 1995; Kovacs et al., 1995
<i>nodY</i>	Неизвестна, определяет образование клубеньков на маще	Bj	Dockendorf et al., 1994
<i>nodZ</i>	Индукцибельный	Sm	Dockendorf et al., 1994
<i>noeA</i>	Метил-трансфераза (?)	Sm	Ardourel et al., 1994
<i>noeB</i>	Неизвестна (белок внутренней мембраны)	Sm	Ardourel et al., 1994
<i>noeC</i>	Арабинозилирование	Ac	Mergaert et al., 1996
<i>noeD</i>	Неизвестна	Bj	Sadowsky et al., 1996
<i>noeE</i>	Сульфатирование фукозы	Rn	Hanin et al., 1997
<i>noeF</i>	Неизвестна	Sf	Sadowsky (не опубликовано)
<i>noeI</i>	2-О-метил-трансфераза	Rn	Freiberg et al., 1997; Jabbouri, Broughton (не опубликовано)
<i>noeJ</i>	Маннозо-1-Р-гуанилил-трансфераза	Rn	Freiberg et al., 1997
<i>noeL</i>	4,6-дегидратаза ГДФ-маннозы	Rn	Freiberg et al., 1997; Jabbouri, Broughton (не опубликовано)

Сокращения: Ac - *Azorhizobium caulinodans*; Be - *Bradyrhizobium elkanii*; Bj - *Bradyrhizobium japonicum*; Re - *Rhizobium etli*; Sf - *Sinorhizobium fredii*; MI - *Mesorhizobium loti*; Rlp, *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*; Rlt, *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*; Rlv, *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae*; Sm - *Sinorhizobium meliloti*; Rn - *Rhizobium* sp. NGR234; RspBR816 - *Rhizobium* sp. BR816; Rt - *Rhizobium tropici*.

Nod-фактор, производимый в результате действия только генов *nodA*, *nodB* и *nodC* имеет биологическую активность и может индуцировать деформацию корневых волосков у вики (Spaink et al., 1991). Структура, приведенная на рисунке 1, могла бы рассматриваться как предшественник всех известных Nod-факторов. Однако на сегодняшний день не известны природные штаммы клубеньковых бактерий, которые производят только “минимальный” Nod-фактор.

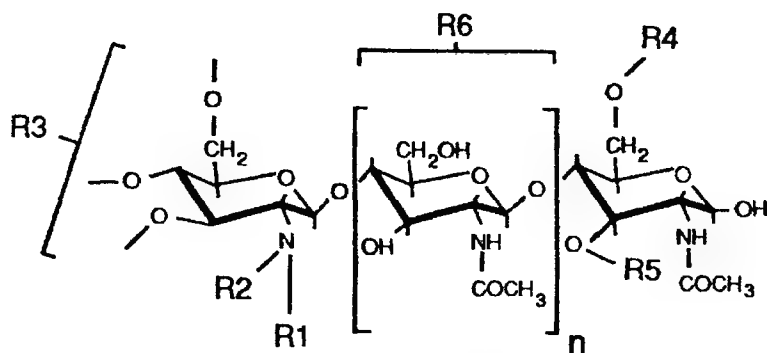
III. Модификации Nod-факторов, специфичные для разных клубеньковых бактерий

Описание химической структуры всех известных Nod-факторов выходит далеко за рамки данной статьи. Мы ограничимся рассмотрением различных типов модификаций, которые он претерпевает. Как показано в таблице 2, на хитиновом “скелете” существует несколько сайтов, которые могут нести различные замещения, а также указаны те модификации, которые являются основными детерминантами хозяйской специфичности во взаимодействиях различных бобовых и клубеньковых бактерий. Существует ряд прекрасных обзоров (Carlson et al., 1994; Downie, 1994; Lerouge, 1994; Martinez-Romero, 1994; Relic et al., 1994; Schultze et al., 1994; Spaink, Lugtenberg, 1994; Fellay et al., 1995; Mylona et al., 1995; Spaink, 1995, 1996; Stacey, 1995; van Rhijn, Vanderleyden, 1995; Denarie et al., 1996; Guertz, Franssen, 1996; Long, 1996; Prome, 1996), в которых подробно разобраны функции Nod-факторов и их биосинтез.

III.A. N-СВЯЗАННЫЕ СПЕЦИФИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ (ГРУППЫ R1 И R2)

На терминальном нередуцирующем глюкозаминовом остатке выявлены только N-связанные заместители, которые всегда несут жирную ацильную группу, и у некоторых клубеньковых бактерий эти заместители метилированы по атому азота. Существует строгая корреляция между специфичностью образования клубеньков и присутствием полиненасыщенной N-связанной жирной ацильной группы на зрелом Nod-факторе. Так, Nod-факторы с полиненасыщенными ацильными группами, производимые *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* и *Sinorhizobium meliloti* (табл. 2), инокулируют бобовые, которые формируют недетерминированные клубеньки, характеризующиеся стабильными меристемами, а также широкими инфекционными нитями (глава 22). Напротив, полиненасыщенные ацильные группы не найдены у тех бактерий, которые в норме индуцируют детерминированные клубеньки, характеризующиеся короткоживущими меристемами, а также распространением ризобии посредством узких инфекционных нитей или через инфекционные карманы (табл. 2). В настоящее время мы не можем утверждать, что данная корреляция присуща всем комбинациям бобовых и клубеньковых бактерий, но важно подчеркнуть, что между структурой Nod-факторов и морфологией инфекционного процесса может иметься связь, основанная на свойствах бобовых, формирующих определенный тип клубеньков.

Гены *nodFE* (табл. 1) кодируют ферменты (ацил-несущий белок и β -кето-ацилсинтазу), участвующие в синтезе жирной кислоты и необходимые для производства полиненасыщенных ацильных групп Nod-факторов, синтезируемых *R. l.* bv. *viciae*, *R. l.* bv. *trifolii* и *S. meliloti* (Spaink et al., 1991, 1995; Demont et al., 1993; Bloemberg et al., 1995a; Van der Drift et al., 1996), хотя у одного из штаммов *R. l.* bv. *trifolii* “дикого типа” полиненасыщенная жирная кислота не была обнаружена (Orgambide et al., 1995; Philip-Hollingsworth et al., 1995). Мутации в генах *nodFE* у *S. meliloti*, *R. l.* bv. *trifolii* и *R. l.* bv. *viciae* приводят к формированию Nod-факторов, несущих только C18:1 ацильную группу. Представляется, что в отсутствие соответствующей ацильной группы белок NodA будет использовать промежуточные соединения из нормального пути биосинтеза жирной кислоты, даже несмотря на то, что белок NodA у таких ризобий как *R. l.* bv. *viciae* и *S. meliloti* имеет преимущественное сродство к присоединению полиненасыщенной ацильной группы (Debelle et al., 1996; Ritsema et al., 1996). Несмотря на то, что мутации по генам *nodFE* снижают способность бактерий к клубенькообразованию (Spaink et al., 1989; Surin, Downie, 1989; Demont et al., 1993) оно, тем не менее, полностью не блокируется. Это показывает, что соответствующая ацильная группа не является совершенно необходимой для клубенькообразования. Интересно отметить, что мутанты *R.*

Таблица 2. Структура Nod-факторов у различных видов ризобий^a

Растение-хозяин ^b	Вид ризобий	Заместители в составе Nod-фактора ^c					n ^d	Ссылки	
		R1	R2 ^e	R3	R4	R5			R6 ^{eh}
<i>Medicago</i>	<i>S. meliloti</i>	H	C16:2.C16:3; C18:C26(w-l)OH	Ac(C-6).H	S	H		1,2,3	1,2,3,4
<i>Vicia</i>	<i>R.l. bv. viciae</i>	H	C18:1.C18:4	Ac(C-6)	H	H		2,3	5
<i>Pisum</i> cv. Afghanistan	<i>R.l. bv. viciae</i> TOM	H	C18:1.C18:4	Ac(C-6)	Ac	H		2,3	6
<i>Trifolium</i>	<i>R.l. bv. trifolii</i>	H	C18:1.C18:3; C20:3.C20:4	Ac(C-6)	H	H		1,2,3	7,8,9
<i>Astragalus</i>	<i>R. huakuii</i>	H	C18:4	H	S	H		3	27
<i>Galega</i>	<i>R. galegae</i>	H	C18:2; C18:3	Cb(C-6)	H	H	Ac(C-3)	2	27
<i>Lotus</i>	<i>M. loti</i>	Me, H	C18:1; C18:1.C18	Cb(C-4); Cb(C-3)	AcFuc, Fuc	H	Fuc	3	10, 26
<i>Phaseolus</i>	<i>R. etli</i>	Me	C18:1	Cb(C-4).H	AcFuc	H		3	11,12
	<i>R. tropici</i>	Me	C18:1	H	S.H	H		3	13,14
	<i>R.l. bv. phaseoli</i>	Me	C18:1	H	H	H		3	15
<i>Acacia</i>	<i>R. sp. GRH2</i>	Me.H	C18:1	H	S.H	H		2,3,4	16
	<i>S. teranga</i>	Me	C16:0.C18:0.C18:1	Cb	S.H	H		3	17
<i>Lablab</i>	<i>R. sp. NGR234</i>	Me	C18:1	Cb(C-6 и C-3 или C-4), H	MeFuc, AcMeFuc, MeSFuc	H		3	18,19
<i>Glycine</i>	<i>S. fredii</i>	H	C18:1	H	MeFuc.Fuc	H	glc	1,2,3	20,21
	<i>B. japonicum</i>	H	C18:1	H	MeFuc	H		3	22,23
	<i>B. elkanii</i>	H.Me	C18:1	Ac(C-6).H,Cb	MeFuc.Fuc	H		2,3	23
<i>Sesbania</i>	<i>A. caulinodans</i>	Me	C18:1	Cb(C-6)	Fuc.H	D-Ara.H		2,3	24,25,28
	<i>S. saheli</i>	Me	C18:1;C16:0	Cb(C-3, C-4 или C-6)	Fuc.H	D-Ara.H		2,3	29
	<i>S. teranga</i> bv. <i>sesbaniae</i>	Me	C18:1;C16:0	Cb(C-3, C-4 или C-6)	Fuc.H	D-Ara.H		2,3	29

^aDenarie et al., 1996.^bроды растений, из которых выделены ризобии.^cу *B. elkanii* терминальный редуцирующий остаток глюкозамина C-1 иногда заменен глицеролом^dжирным выделено наиболее часто встречающееся количество остатков глюкозамина.^eуказаны некоторые остатки жирных кислот.^fу *M. loti* Fuc связан α(1→3) связью с глюкозамином, находящимся вблизи ацилированного глюкозамина.^gу *R. galegae* ацетильная группа связана с 3-С атомом глюкозамина, находящимся вблизи редуцирующего глюкозамина.^hодин из минорных компонентов Nod-фактора, синтезируемых *S. fredii*, содержит остаток глюкозы вместо глюкозамина.

Ссылки: 1 - Lerouge et al., 1990; 2 - Roche et al., 1991b; 3 - Schultze et al., 1992; 4 - Demont et al., 1993; 5 - Spink et al., 1991; 6 - Firmin et al., 1993; 7 - Spink et al., 1995a; 8 - Orgambide et al., 1995; 9 - Van der Drift et al., 1996; 10 - Lopez-Lara et al., 1995a; 11 - Cardenas et al., 1995; 12 - Poupot et al., 1995a; 13 - Poupot et al., 1993; 14 - Folch-Mallol et al., 1996; 15 - K.E. Wilson, R. Carlson, J. Firmin, J.A. Downie (не опубликовано); 16 - Lopez-Lara et al., 1995b; 17 - Lorquin et al., 1997; 18,19 - Price et al., 1992, 1996; 20,21 - Bec-Ferte et al., 1994, 1996; 22 - Sanjuan et al., 1992; 23 - Carlson et al., 1993; 24,25 - Mergaert et al., 1993, 1996; 26 - Olsthoorn et al., 1997; 27 - Yang et al., 1997; 28 - Mergaert et al., 1997; 29 - Lorquin et al., 1997.

I. bv. trifolii по гену *nodE* приобретают способность инокулировать горох (Djordjevic et al., 1985). В отсутствие генов *nodFE* функции других *nod*-генов могут становиться решающими для образования клубеньков. Так, например, у *R. I. bv. viceae* секретируемый белок NodO становится важным для частичного сохранения способности к клубенькообразованию у *nodFE*-мутанта (Downie, Surin, 1990; Esonomou et al., 1994). У *S. meliloti* белок NodL играет важную роль для сохранения вирулентности мутантов по гену *nodE*, тогда как для бактерий с работающим геном *nodE* фактор NodL не имеет значения для проявления функции клубенькообразования (Ardourel et al., 1994).

Анализ гомологии аминокислотных последовательностей белков позволяет предположить, что NodG является дегидрогеназой, вовлеченной в синтез ацильного радикала жирной кислоты и таким образом участвует в синтезе жирной группы Nod-фактора. Несмотря на это, мутации по данному гену не оказывают видимого эффекта на биосинтез Nod-фактора, возможно из-за существования гомолога, компенсирующего утраченную функцию (Demont et al., 1993).

Второй N-связанной модификацией терминального нередуцирующего глюкозаминного остатка является присоединение посредством NodS (S-аденозил метионин-метилтрансферазы) N-связанной метильной группы (Geelen et al., 1993, 1995; Jabbouri et al., 1995). Эта модификация не наблюдается у Nod-факторов, несущих полиненасыщенные ацильные группы и поэтому гены *nodS*, как представляется, отсутствуют у штаммов, которые имеют гены *nodF* и *nodE*. Гены *nodS* принимают участие в определении хозяйской специфичности (Lewin et al., 1990). Возможно, что белок NodS катализирует деацетилирование хитоолигосахаридов до стадии ацилирования жирной кислотой, которая проходит при участии белка NodA (Geelen et al., 1995; Jabbouri et al., 1995; Mergaert et al., 1995). Возможно, что присутствие N-метильной группы предотвращает присоединение полиненасыщенной жирной кислоты, содержащей двойные связи, конъюгированные с эфирной связью.

III.B. O-СВЯЗАННЫЕ МОДИФИКАЦИИ КОНЦЕВОГО НЕРЕДУЦИРУЮЩЕГО ОСТАТКА (ГРУППА R3)

В эту группу входят два типа замещений. Одно из них — это ацетильная группа, присоединяемая к 6-С позиции с помощью белка NodL, который представляет собой O-ацетил-трансферазу (Downie, 1989; Bloembergen et al., 1994, 1995b). Этот фермент принадлежит к группе специфических O-ацетилтрансфераз, некоторые из которых достаточно хорошо изучены. NodL структурно сходен с этими белками, что показано на основании его аминокислотной последовательности, а также по данным предварительного кристаллографического анализа (Dunn et al., 1996). Возможно, что NodL действует на Nod-фактор после белка NodB, но до ацилизации, осуществляемой белком NodA, поскольку олигомеры хитина, деацетилированные NodB, являются значительно лучшими субстратами, чем неацетилированные олигомеры, а N-ацилизация подавляет способность NodL производить O-ацетилирование (Blomberg et al., 1995b). Интересно, что существует негативная корреляция между присутствием у ризобий генов *nodL* и *nodS*. Ни у одного из изученных штаммов не удалось выявить функциональных копий обоих генов и таким образом не существует Nod-факторов, которые несли бы N-метильную группировку вместе с NodL-контролируемым присоединением O-ацетильной группы.

Вторым типом O-связанного замещения является наличие карбамоильной группы, обнаруженной в C4, C5 и(или) в C4 позициях. Представляется, что существуют специфические O-карбамоильные трансферазы, одна из которых, NodU, вовлечена в карбамоилирование C6 позиции (Geelen et al., 1993; Jabbouri et al., 1995).

III.C. O-СВЯЗАННЫЕ ЗАМЕЩЕНИЯ РЕДУЦИРУЮЩЕГО ГЛЮКОЗАМИНА

Наиболее часто замещаемая позиция в Nod-факторе — это C-6 позиция редуцирующего глюкозаминного остатка. Эти замещения обычно очень важны для специфики клубенькообразования у бобовых.

III.C.1. 6-О-сульфат

В сульфатирование Nod-факторов вовлечены три белка — NodH, NodP и NodQ. Такое сульфатирование является решающим для специфичности образования клубеньков: так, *nodH*-мутанты *S. meliloti*, которые производят несulfатированный Nod-фактор, теряют способность инокулировать люцерну, но приобретают способность формировать клубеньки у вики (Faucher et al., 1988; Lerouge et al., 1990; Roche et al., 1991a). Этот ген кодирует сульфотрансферазу, которая катализирует передачу сульфатной группы на несulfатированный Nod-фактор или олигомер хитина (Ehrhardt et al., 1995; Schultze et al., 1995; Bourdineaud et al., 1995). Nod-факторы с присоединенным остатком жирной кислоты являются предпочтительными субстратами, поэтому сульфатирование происходит после ацилирования (Schultze et al., 1995). Как показано на рисунке 2, субстратом, используемым NodH в качестве донора сульфата является ФАФС (3-фосфоаденозин-5-фосфосульфат). Он формируется в результате активности белков NodP и NodQ, которые совместно формируют комплекс АТФ с сульфурилазной и аденозин 5-фосфосульфатной (АФС)-киназной активностями (Schwedock, Long, 1990, 1992; Leyh et al., 1992; Schwedock et al., 1994; Folch-Mallol et al., 1996; Laeremans et al., 1996). Мутации в генах *nodP* или *nodQ* у *S. meliloti* вызывает продукцию смеси сульфатированных и несulfатированных факторов и это определяет способность мутантов вызывать клубенькообразование как у люцерны, так и у вики (Roche et al., 1991a). Причиной этого является то, что *S. meliloti* несет дополнительные гомологи генов *nodPQ*, которые обеспечивают способность формировать достаточное количество ФАФС, что позволяет проводить определенную модификацию Nod-фактора (Schwedock, Long, 1989, 1992). Гомологи генов *nodPQ*, возможно, принимают участие в формировании ФАФС, который используется для такой реакции, как сульфатирование липополисахарида (Cedergren et al., 1995). Именно концентрация ФАФС может быть лимитирующим фактором в процессе сульфатирования у некоторых клубеньковых бактерий (Poupot et al., 1995b).

Присутствие сульфатной группы играет ключевую роль в узнавании Nod-факторов некоторыми бобовыми, такими как *Medicago* spp. (Roche et al., 1991a; Journet et al., 1994). Кроме того, было отмечено, что сульфатирование Nod-фактора придает ему устойчивость к действию растительных хитиназ (Stachelin et al., 1994a, 1994b, 1995).

III.C.2. 6-О-ацетил

Ген *nodX* кодирует О-ацетилтрансферазу, которая требуется для образования клубеньков на афганских горохах, устойчивых к инокуляции большинством штаммов *R. l. bv. viceae* (Firmin et al., 1993). Эта устойчивость наследуется как моногенный рецессивный признак, и тот факт, что для преодоления устойчивости требуется ген *nodX*, был истолкован как свидетельство изменения рецептора Nod-фактора у афганских горохов (Kozik et al., 1995). Ген *nodX* был впервые выявлен у штамма ТОМ, который способен инокулировать горохи афганского происхождения. Штаммы, несущие *nodX*, производят смесь пента- и тетрамерных Nod-факторов, но только пентамерные формы являются ацетилированными. Хотя как NodX, так и NodL являются О-ацетил-трансферазами, которые ацетируют С-6 глюкозамин, вызывает удивление то, что между этими белками очень мало сходства (Davis et al., 1988; Downie, 1989), так что NodX даже относят к специфической группе О-ацетилаз (Clark et al., 1991).

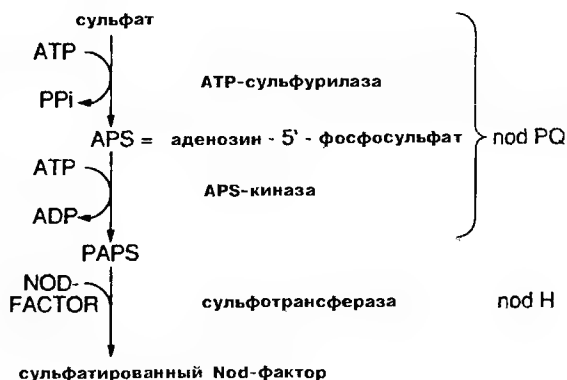


Рисунок 2. Сульфатирование Nod-факторов. Гены *nodPQ* гомологичны генам *cysD* и *cysC+cysN* *Escherichia coli*, соответственно.

III.C.3. 6-О-гликозиды

В этой позиции были обнаружены различные фукозилльные группировки. Разные производные фукозы (метилфукоза, ацетил-метилфукоза, ацетилфукоза и сульфатированная метилфукоза) были обнаружены у разных штаммов клубеньковых бактерий (табл. 2). В случае потери фукозной группы (из-за мутации гена *nodZ*) *B. japonicum* становится неспособным инокулировать сиратро (Stacey et al., 1994). Было показано, что гены *nodZ* и *nolK* вовлечены в синтез и присоединение 3-метилфукозной группы. Считается также, что в этом процессе принимают участие гены *B. japonicum* *nolM* и *nolO* (Luka et al., 1993; Mergaert et al., 1996). Показано, что *NolK* участвует в синтезе ГДФ-фукозы, а *NodZ* является фукозилтрансферазой (Stacey et al., 1994; Fellay et al., 1995a; Lopez-Lara et al., 1996; Quinto et al., 1997). Перенос гена *nodZ* в *R. l. bv. viceae* ведет к выработке Nod-факторов, несущих фукозу в С-6 позиции. Это делает *R. l. bv. viceae* способным вызывать клубенькообразование у различных тропических бобовых, у которых ранее эти бактерии не формировали клубеньков (Lopez-Lara et al., 1996). Важным представляется тот факт, что *R. l. bv. viceae*, несущий ген *nodZ*, также приобретает способность вызывать клубенькообразование у афганских горохов (Ovtsyna et al., 1998). Таким образом, фукозный заместитель может функционально заменить ацетильную группу, присоединяемую к этой же позиции посредством белка *NodX*. Принимая во внимание, что эти заместители совершенно различны по своей структуре, трудно представить связь таких изменений в структуре Nod-фактора с особенностями его функционирования в специфической системе узнавания афганских горохов. Альтернативным является представление о том, что такое изменение может увеличивать устойчивость модифицированного Nod-фактора к деградации или препятствовать индукции защитной реакции на появление неспецифичного Nod-фактора (глава 21).

Формирование ацетил-фукозы у *M. loti* зависит от действия гена *nolL*. Белок *NolL* функционально сходен с *NodX*, который также является фукозо-О-ацетил-трансферазой (Scott et al., 1996). Ген *nolL* был идентифицирован также у *Rhizobium* sp. NGR234 (Freiberg et al., 1997), где он участвует в ацетилировании фукозы (Jabbouri, Broughton, личное сообщение). Белок *NoeE* участвует в сульфатировании фукозы (Hanin et al., 1997). У *Rhizobium* sp. NGR234 присутствуют также гены *noeJ*, *noeK* и *noeL* (Freiberg et al., 1997), которые вовлечены в биосинтез ГДФ-фукозы, тогда как *noeI* — это О-метил-трансфераза, участвующая в 2-О-метиловании фукозы (Jabbouri, Broughton, личное сообщение). На рисунке 3 суммированы данные о возможной роли нескольких продуктов *nod*-генов в биосинтезе ГДФ-фукозы.

III.C.4. 3-О-арабиноза

У *A. caulinodans*, *S. saheli* и *S. teranga* bv. *sesbaniae* арабиноза может быть представлена в позиции С-3 редуцирующего остатка глюкозамина (Mergaert et al., 1997; Lorquin et al., 1997). Изначально полагали, что арабиноза присутствовала в С6 (скорее чем в С5) положении редуцирующего остатка глюкозамина в структуре Nod-фактора *A. caulinodans* (Mergaert et al., 1993, 1996), но это, возможно, было артефактом использования рекомбинантного штамма, с помощью которого нарабатывали Nod-фактор (Mergaert et al., 1997). Ген *noeC*, который кодирует белок, потенциально способный интегрироваться в мембрану, как представляется, вовлечен в присоединение арабинозы, поскольку мутации по *noeC* блокируют присоединение арабинозы. Однако не исключено, что *nolK* и другой ген(ы), работающий после *noeC*, также может участвовать в присоединении арабинозы (Mergaert et al., 1996).

III.C.5. 1-О-глицерол

Некоторые Nod-факторы, производимые штаммами *Bradyrhizobium japonicum*, несут в своей структуре глицерол, присоединенный к редуцирующему остатку глюкозамина (Carlson et al., 1993; Luka et al., 1993). Такие Nod-факторы обычно являются минорными составляющими у бактерий дикого типа и могут представлять собой промежуточные стадии биосинтеза (Carlson et al., 1994). Не было обнаружено генов, которые могли бы быть вовлечены в присоединение глицерола к Nod-фактору.

III.D. ЗАМЕЩЕНИЯ НЕКОНЦЕВОГО ОСТАТКА

Известно относительно немного модификаций Nod-фактора по неконцевым сахарным остаткам. У некоторых штаммов *Mesorhizobium loti* один из минорных компонентов Nod-факторов содержит остаток глюкозы, замещающий N-ацетил-глюкозамин в качестве центрального сахара в пентамерном скелете (Вес-Ferte et al., 1996). У *R. galegae* N-ацетил-глюкозамин, прикрепленный к ацилированному остатку глюкозамина, является O-ацетилированным по С-3 позиции (Yang et al., 1997). Предположительно, для этого замещения необходим *nod*-ген, обеспечивающий O-ацетилтрансферазную активность, однако пока такой ген не обнаружен.

У *M. loti* сахарный "скелет" Nod-фактора замещен метил-фукозным остатком, который является α -1,3-связанным с 3-С глюкозамином, в чего результате возникает разветвленный олигосахарид. Это обстоятельство указывает на необходимость присутствия α -(1,3)-фукозил-трансферазы, однако соответствующий ген пока не обнаружен (Olsthooorn et al., 1997).

IV. Секреция Nod-факторов

Анализ бактериальных генов, кодирующих транспортные системы, обычно затруднен в связи с избыточностью переносчиков, и это осложняет понимание деталей экспорта Nod-факторов. Уже выяснено, что гены *nodI* и *nodJ* играют важную роль в секреции Nod-факторов (McKay, Djordjevic, 1993; Spaink et al., 1995b; Cardenas et al., 1996; Fernandez-Lopez et al., 1996), хотя также весьма вероятно, что другие транспортные системы могут компенсировать отсутствие переносчиков, кодируемых *nodIJ*. На основании сходства первичной последовательности полипептидов стало ясно (Evans, Downie, 1985; Gottfert et al., 1989; Vazquez et al., 1993; Geelen et al., 1993), что белки NodIJ могут быть вовлечены в транспорт Nod-факторов. NodI содержит АТФ-связывающий мотив (Evans, Downie, 1985) и входит в состав цитоплазматической мембраны (Schlaman et al., 1990), а также содержит мотив лейциновой сшивки (Gottfert, 1993), что указывает на то, что он может формировать димеры или комплексы с другими белками. NodJ является интегрированным мембранным белком (Surin et al., 1990; Vazquez et al., 1993), который имеет гидрофобные свойства, сходные с другими интегрированными мембранными транспортными белками.

Мутации в генах *nodIJ* оказывают относительно малое влияние на способность к клубенькообразованию у *R. l. bv. viceae* (Downie et al., 1985; Spaink et al., 1995b), *B. japonicum* (Gottfert et al., 1989) и *A. caulinodans* (Geelen et al., 1993). Тем не менее подтверждено, что эти гены являются важными для инокуляции клевера штаммами *R. l. bv. trifolii* или фасоли - *R. elii* (Djordjevic et al.,

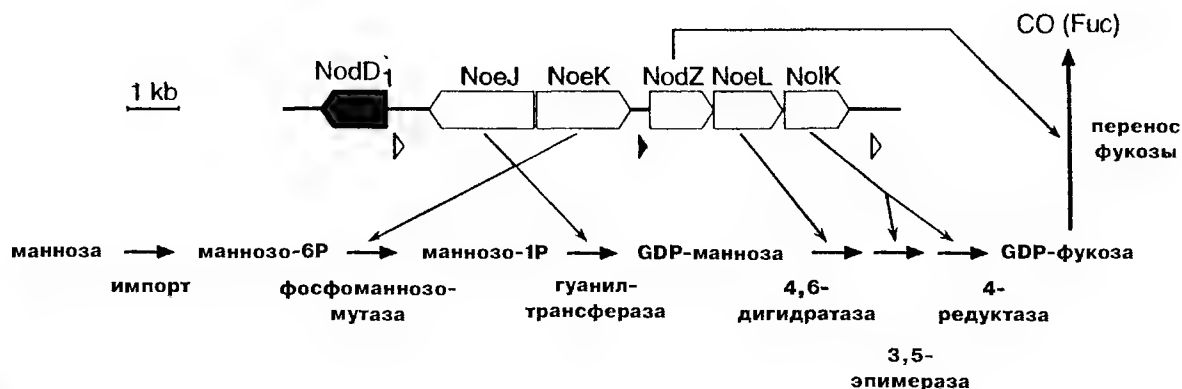


Рисунок 3. Биосинтез ГДФ-фукозы у штамма NGR234 *Rhizobium* spp. (по данным работы: Quesada-Vincens et al., 1977).

1985; Canter-Cremers et al., 1988; Fernandez-Lopez et al., 1996). Белки NodI и NodJ имеют большое сходство с бактериальными белками, которые участвуют в транспорте капсульных полисахаридов (Vazquez et al., 1993). Отсутствие четко выраженного фенотипического проявления у *nodI*- и *nodJ*-мутантов ряда ризобий можно объяснить тем, что Nod-фактор экспортируется тем же путем, которым осуществляется в норме экскреция полисахаридов.

Ген *nodT* располагается непосредственно "ниже по течению" за генами *nodIJ* у *R. l. bv. trifolii* (Surin et al., 1990), тогда как у *R. l. bv. viceae* он находится в составе оперона *nodMNT*. Мутации в гене *nodT* у *R. l. bv. viceae* или у *R. l. bv. trifolii* мало изменяют способность к образованию клубеньков или вообще на нее не влияют (Surin et al., 1990; Lewis-Henderson, 1991), хотя перенос *nodT* в штаммы *R. l. bv. trifolii*, у которых отсутствовал этот ген, позволил реципиенту инокулировать клевер сорта Вулгенеллуп (Lewis-Henderson, Djordjevic, 1991). Белок NodT находится во внешней мембране и относится к семейству белков, которые выполняют функцию секреции метаболитов через мембраны клетки (Rivilla et al., 1995). На основании аналогий с другими секреторными системами, возникло предположение о том, что NodT может быть частью комплекса, обеспечивающего экскрецию Nod-факторов совместно с белками NodI и NodJ (Downie, 1994; Rivilla et al., 1995). Однако прямых доказательств того, что NodT выполняет данную функцию, пока не получено.

Гены *nodFGHI* были найдены только у *S. meliloti*, и они находятся в том же опероне, что *nodM* и *nodN* (Baev et al., 1991). Мутации по генам *nodFGH* уменьшают или полностью подавляют способность к инфицированию видов *Medicago*. Маловероятно, что подавление инокуляции вызвано полярным эффектом этих генов на следующий за ними по течению ген *nodN*, поскольку мутации по генам *nodFGHI* оказывали намного меньший эффект на продукцию Nod-фактора (согласно данным по биотесту), чем мутации по *nodN*. Продукт гена *nodF*, как предполагается, близок к встроенным мембранным белкам (Baev et al., 1991), а продукт генов *nodGHI* можно отождествить с единичными встроенными мембранными белками, такими как SngA и CscA, которые участвуют в транспорте кобальта, никеля и цинка. На базе этого сходства высказано предположение о том, что *nodFGHI* гены могут быть также вовлечены в экспорт Nod-факторов (Saier et al., 1994). Однако удалось показать, что мутации по данным генам оказывают очень небольшое влияние на деформацию корневых волосков, что свидетельствует о том, что данные мутации не имеют значительного влияния на экспорт Nod-фактора (Baev et al., 1991).

V. Секреция белков

Относительно немного генов, контролирующих клубенькообразование, вовлечено в экспорт белков из клеток. Наиболее известным среди них является NodO, выявленный у *R. l. bv. viceae* (De Maagd et al., 1989; Economou et al., 1990). Он является кальций-связывающим белком, который формирует катион-селективные поры в мембране (Sutton et al., 1993), причем гомологичные ему белки были обнаружены у широкого круга *Rhizobium* (van Rhijn et al., 1996). Представляется, что NodO не участвует в биосинтезе Nod-факторов, их связывании или экспорте (Spaink et al., 1991; Sutton et al., 1994), хотя он определенно стимулирует клубенькообразование у мутантов, которые синтезируют не полностью декорированный Nod-фактор. Так, у мутантов *R. l. bv. viceae* по гену *nodE* ген *nodO* необходим для клубенькообразования (Surin, Downie, 1990; Economou et al., 1994), хотя сам по себе *nodO* слабо влияет на образование клубеньков. Клонированный ген *nodO* после его переноса между разными видами ризобий способен расширить спектр клубенькообразования у реципиентов (Economou et al., 1994; van Rhijn et al., 1996). Хотя его функция точно не известна, предполагается (Sutton et al., 1994), что он стимулирует клубенькообразование, изменяя поток ионов через плазматическую мембрану клеток корня, а возможно и усиливая действие Nod-фактора на концентрацию ионов внутри клетки (Ehrhardt et al., 1992, 1996; Felle et al., 1995, 1996; Kurkdjian, 1995). Гены, которые определяют экспорт белка NodO, не являются *nod*-генами (Scheu et al., 1992) и NodO секретируется через транспортную систему I типа, которая выносит из клетки и другие (не вовлеченные в образование клубеньков) белки (Finnie et al., 1996, 1997). Поскольку NodO воздействует только на клетки, которые имеют прямой контакт с бактериями, он, возможно, принимает участие в инфекционном процессе.

Ряд флавоноид-индуцируемых белков из других клубеньковых бактерий был обнаружен в супернатантах бактериальных культур (Krishnan, Pueppke, 1993), но они не были достаточно подробно охарактеризованы. Набор генов *nolXWBTUV* у *S. fredii* участвует в определении хозяйской специфичности, мутации в любом из этих генов делают штаммы *S. fredii* способными инокулировать генотипы сои, которые в норме являются устойчивыми к этим штаммам (Meinhardt et al., 1993). Подобный кластер генов обнаружен у другой клубеньковой бактерии - *Rhizobium* sp. NGR234 (Freiberg et al., 1997). *NolW* и *NolT* являются гомологичными белкам, вовлеченным в секрецию белков, типичных для бактериальных патогенов растений (Van Gijsegem et al., 1995). Экспрессия генов *nolBTUV* и *nolX* индуцируется флавоноидами, тогда как *nolW* является конститутивно экспрессирующимся (Kovacs et al., 1995). Возможно, что эти гены вовлечены в секрецию белков, которые блокируют клубенькообразование у некоторых генотипов сои, что могло бы объяснить наблюдение, согласно которому мутации в любом из этих генов (контролирующих дополнительную систему экспорта) могут увеличить количество образующихся клубеньков.

VI. Гены с неизвестными функциями

Биохимические функции некоторых *nod*-генов пока не выяснены. Для тех генов, которые не имеют гомологов в существующих базах данных, часто бывает трудно даже высказать разумные предположения. Однако продукты ряда генов имеют четкие биологические эффекты. Для полноты картины представляется необходимым упомянуть некоторые из них.

Ген *nodK* - один из первых описанных генетических факторов, контролирующих клубенькообразование (Scott, 1986), причем он был выявлен у штамма *Rhizobium* sp. NGR234, имеющего необычайно широкий спектр хозяев, включающий даже небобовое растение *Parasponia*. Ген *nodK* находится в начале оперона *nodABCII*, но никаких функций для него установить не удалось. У *B. japonicum* он наиболее тесно сцеплен с геном *nodY*, который также находится перед геном *nodA* (Nieuwkoop et al., 1987). Возможно, что оба гена (*nodY* и *nodK*) кодируют цитоплазматические белки.

Функция гена *nodN* также не установлена. Он был локализован в том же опероне, что и *nodM* у *R. l. bv. viceae* и *S. meliloti* (Surin, Downie, 1988; Baev et al., 1991), причем мутации по гену *nodN* уменьшают количество Nod-фактора у *S. meliloti* (Baev et al., 1991). Таким образом, также как и *nodM*, он может быть вовлечен в синтез предшественников, требуемых для формирования УДФ-N-ацетилглюкозамина.

Ген *nolC* обнаружен как один из генов *S. fredii* (штамм USDA257), мутации в котором позволяют этому штамму инокулировать сою сорта McCall (Krishnan, Pueppke, 1991a, 1992). Продукт этого гена может быть растворимым белком, сходным с DnaJ - белками теплового шока бактерий (Krishnan, Pueppke, 1991a). В отличие от DnaJ, белок *NolC* не индуцируется тепловым шоком, отсутствуют также данные о том, что он находится под контролем регулятора NodD.

Ген *nolJ* является одним из двух генов, идентифицированных у *S. fredii*, активность которых индуцируется изофлавонами (Sadowsky et al., 1988; Boundy-Mills et al., 1994). Каждый из этих генов имеет свой собственный промотор, причем наблюдается некоторое сходство в структуре промоторов, однако нет гомологии (или она незначительна) с районом *nod*-box, характерным для генов клубенькообразования. Мутации по гену *nolJ* ингибируют клубенькообразование у сои, а изменения гена, лежащего выше от *nolJ*, подавляют конкурентоспособность ризобий.

Гены *nolP* и *nolE* были идентифицированы как факторы, лежащие ниже промоторов *nod*-box у *R. l. bv. phaseoli* (Davis, Johnston, 1990). Ген *nolE* предшествует *nodDI* в изофлавоноид-индуцируемом опероне. Функция этого гена не выявлена, хотя его продукт, по-видимому, располагается в периплазме (Michiels et al., 1995). Белок-продукт гена *nolP*, предположительно, является коротким гидрофильным белком. Гомологии с известными последовательностями для этих двух генов не обнаружено, мутации по данным факторам не оказывают видимого эффекта на образование клубеньков у *Phaseolus*. У *R. l. bv. phaseoli* был идентифицирован еще один ранее неизвестный ген, который влияет на конкурентоспособность (Michiels et al., 1995).

Ген *nolN*, обнаруженный у *B. japonicum*, является частью оперона *nodYABCSUIJnolMN*O и анализ функции белка NolN осложняется тем фактом, что полученные делеции распространялись на ген *nolO*. Тем не менее, не было зарегистрировано изменений в продукции Nod-фактора при сравнении делеций в *nolNO* районе по сравнению с мутациями *nolO*. Первичный эффект этих мутаций заключался в изменении метил-фукозильной группы Nod-фактора (Luka et al., 1993).

Гены *nolQ* и *nolS* были идентифицированы ниже по ходу от промотора *nod-box* *S. meliloti* хотя они лишь в очень слабой степени подвержены индукции при воздействии флавоноидов (Plazenet et al., 1995). Предполагаемый продукт гена *nolQ* *S. meliloti* Rm41, возможно, кодируется двумя открытыми рамками считывания, обозначенными как *nolQa* и *nolQb* у штамма SU47 *S. meliloti*. Мутации по *nolQ* вызывают уменьшение эффективности инокуляции *Medicago lupulina* и этот эффект был аддитивным к действию мутаций по генам *nodFE*. Мутации, подавляющие функцию *nolQ*, по-видимому, не влияют на биосинтез Nod-фактора. Ниже расположенный ген *nolS* кодирует белок, сходный с белком ThiI *S. meliloti*, участвующим в синтезе тиамина, однако пока не были получены инсерционные мутанты по данному гену, и поэтому соответствующий фенотип неизвестен (Plazenet et al., 1995).

У клубеньковых бактерий *B. japonicum* ниже от NodD- (и NodW-) регулируемого промотора *nod-box* обнаружены гены *nolYZ* (Dockendorf et al., 1994). Мутации по *nolY* влияли на клубенькообразование у вигны, но такой эффект не был обнаружен в случае мутации по *nolZ*. Также не выявлено влияния *nolY*-мутаций на продукцию Nod-фактора и не установлено гомологии NolY с другими известными белками.

Гены *noeA* и *noeB* обнаружены ниже гена *nodL* у *S. meliloti* и мутации в любом из них сильно ингибируют клубенькообразование у *Medicago lupulina* и *M. littoralis* (но не у *Medicago truncatula*). Формирование инфекционных нитей сильно изменено, при отсутствии эффекта на синтез Nod-фактора (Ardourel et al., 1995). Структура белка NoeA имеет ограниченную гомологию с метилтрансферазой в области домена, вовлеченного в связывание с S-аденозил метионином у *E. coli*, но гомология с белком NodS незначительна. Ген *noeB*, возможно, кодирует встроенный мембранный белок, не имеющий известной гомологии.

VII. Заключительные замечания

Хотя совершенно ясно, что биосинтез Nod-фактора связан с функциями продуктов *nod*-генов, эти гены могут иметь и иные функции. Некоторые из этих генов могут влиять на инфекционные процессы, возможно у специфических видов бобовых. Сейчас не ясно, как функционируют некоторые из этих генов, однако по мере накопления данных о структуре новых *nod*-генов, возможно, будут прояснены и их функции. Секвенирование геномов внесло заметный вклад в поиск новых *nod*-генов, например, гены *noeIJKL* были идентифицированы в составе симбиотической плазмиды *Rhizobium sp.* NGR234 (Freiberg et al., 1997). Поскольку в настоящее время проводится изучение ряда новых необычных штаммов ризобий (Lortet et al., 1996; Clutier et al., 1996; Lorquin et al., 1997), возможно, что будут идентифицированы и другие *nod*-гены, связанные с контролем эффективности инокуляции, а также конкурентоспособности ризобий.

В настоящий момент номенклатура *nod*-генов координируется проф. Гарри Стейси (Prof. G. Stacey, Department of Microbiology, University of Tennessee, Knoxville, TN 37996-0845, USA, e-mail: GSTACEY@utk.edu), которому и следует направлять запросы по поводу вновь обнаруженных *nod*-генов.

VIII. Благодарности

Я в долгу перед многими коллегами за предоставление последних ссылок, особенно хочу поблагодарить Ф. Дебелле, Дж. Денарье, Дж.С. Промэ. Я признателен также Г. Спайнку, А. Кондороши, Г. Стейси и Р. Фишеру за полезные комментарии, а К.Е. Уилсону, Дж. Фирмину, Р. Карлсону, В. Бройтону, С. Ябури, М. Садовскому, Г. Спайнку и Дж. Денарье за предоставление неопубликованной информации. Работа поддержана BBSRC.

IX. Литература

- Ardourel M., Demont N., Debelle F., Maillet F., De Billy F., Prome J.C., Denarie J., Truchet G. (1994) *Plant Cell*. V. 6, p. 1357-1374.
- Ardourel M., Lortet G., Maillet F., Roche P., Truchet G., Prome J.C., Rosenberg C. (1995) *Mol. Microbiol.* V. 17, p. 687-699.
- Atkinson E.M., Palcic M.M., Hindsgaul O., Long S.R. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 91, p. 8418-8422.
- Baev N., Endre G., Petrovics G., Banfalvi Z., Kondorosi A. (1991) *Mol. Gen. Genet.* V. 228, p. 113-124.
- Baev N., Kondorosi A. (1992) *Plant Mol. Biol.* V. 18, p. 843-846.
- Baev N., Schultze M., Barber I., Ha D.C., Virelizier H., Kondorosi E., Kondorosi A. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 7555-7565.
- Balatti P.A., Kovacs L.G., Krishnan H.B., Pueppke S.G. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 693-699.
- Bamy M.A., Downie J.A. (1993) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 6, p. 669-672.
- Bamy M.A., Schoonejans E., Economou A., Johnston A.W.B., Downie J.A. (1996) *Mol. Microbiol.* V. 19, p. 443-453.
- Bec-Ferte M.P., Krishnan H.B., Prome D., Savagnac A., Pueppke S.G., Prome J.C. (1994) *Biochemistry*. V. 33, p. 11782-11788.
- Bec-Ferte M.P., Krishnan H.B., Savagnac A., Pueppke S.G., Prome J.C. (1996) *FEBS Letters*. V. 393, p. 273-279.
- Bibb M.J., Biro S., Motamedi H., Collins J.F., Hutchinson C.R. (1989) *EMBO J.* V. 9, p. 2727-2736.
- Bloemberg G.V., Kamst E., Harteveld M., van der Drift K.M.G.M., Haverkamp J., Thomas-Oates J.E., Lugtenberg B.J.J., Spalink H.P. (1995a) *Mol. Microbiol.* V. 16, p. 1123-1136.
- Bloemberg G.V., Lagas R.M., van Leeuwen S., Van der Marel G.A., Van Boom J.H., Lugtenberg B.J.J., Spalink H.P. (1995b) *Biochemistry*. V. 39, p. 12712-12720.
- Bloemberg G.V., Thomas-Oates J.E., Lugtenberg B.J.J., Spalink H.P. (1994) *Mol. Microbiol.* V. 11, p. 793-804.
- Boundy-Mills K.L., Kossak R.M., Tully R.E., Pueppke S.G., Lohrke S., Sadowsky M.J. (1994) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 305-308.
- Bourdmeaud J.P., Bono J.-J., Ranjeva R., Cullimore J.V. (1995) *Biochem. J.* V. 306, p. 259-264.
- Canter-Cremers H.C.J., Wijffelman C.A., Pees E., Rolfe B.G., Djordjevic M.A., Lugtenberg B.J.J. (1988) *J. Plant Physiol.* V. 132, p. 398-404.
- Cardenas L., Dominguez J., Quinto C., Lopez-Lara I.M., Lugtenberg B.J.J., Spalink H.P., Rademaker G.J., Haverkamp J., Thomas-Oates J.E. (1995) *Plant Mol. Biol.* V. 29, p. 453-464.
- Cardenas L., Dominguez J., Santana O., Quinto C. (1996) *Gene*. V. 173, p. 183-187.
- Carlson R.W., Price N.P.J., Stacey G. (1994) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 684-695.
- Carlson R.W., Sanjuan J., Bhat U.R., Glushka J., Spalink H.P., Wijffes A.H.M., van Brussel A.A.N., Stokermans T.J.W., Peters N.K., Stacey G. (1993) *J. Biol. Chem.* V. 268, p. 18372-18381.
- Cedergren R.A., Lee J.G., Ross K.L., Hollingsworth R.I. (1995) *Biochemistry*. V. 34, p. 4467-4477.
- Clark C.A., Beltrame J., Manning P.A. (1991) *Gene*. V. 107, p. 43-52.
- Cloutier J., Laberge S., Prevost D., Antoun H. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 523-531.
- Davis E.O., Evans I.J., Johnston A.W.B. (1988) *Mol. Gen. Genet.* V. 212, p. 531-535.
- Davis E.O., Johnston A.W.B. (1990) *Mol. Microbiol.* V. 4, p. 921-932.
- De Lajudie P., Willems A., Pot B., Dewettinck D., Maestrojuan G., Neyra M., Collins M.D., Dreyfus B., Kersters K., Gillis M. (1994) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 44, p. 715-733.
- De Maagd R.A., Wijffes A.H.M., Spalink H.P., Ruiz-Sainz J.E., Wijffelman C.A., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 6764-6770.
- Debelle F., Plazancet C., Roche P., Pujol C., Savagnac A., Rosenberg C., Prome J.C., Denarie J. (1996) *Mol. Microbiol.* V. 22, p. 303-314.
- Demont N., Debelle F., Aurelle H., Denarie J., Prome J.C. (1993) *J. Biol. Chem.* V. 268, p. 20134-20142.
- Denarie J., Debelle F., Prome J.C. (1996) *Annu. Rev. Biochem.* V. 65, p. 503-535.
- Djordjevic M.A., Schofield P.R., Rolfe B.G. (1985) *Mol. Gen. Genet.* V. 200, p. 463-471.
- Dockendorff T.C., Sharma A.J., Stacey G. (1994) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 173-180.
- Downie J.A. (1989) *Mol. Microbiol.* V. 3, p. 1649-1651.
- Downie J.A. (1994) *Trends Microbiol.* V. 2, p. 318-324.
- Downie J.A., Knight C.D., Johnston A.W.B. (1985) *Mol. Gen. Genet.* V. 198, p. 255-262.
- Downie J.A., Sunn B.P. (1990) *Mol. Gen. Genet.* V. 222, p. 81-86.
- Dunn S.M., Moody P.C.E., Downie J.A., Shaw W.V. (1996) *Prof. Sci.* V. 5, p. 538-541.
- Economou A., Davies A.-E., Johnston A.W.B., Downie J.A. (1994) *Microbiology*. V. 140, p. 2341-2347.
- Economou A., Hamilton W.D.O., Johnston A.W.B., Downie J.A. (1990) *EMBO J.* V. 9, p. 349-354.
- Ehrhardt D.W., Atkinson E.M., Faull K.F., Freedberg D.I., Sutherim D.P., Armstrong R., Long S.R. (1995) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 6237-6245.
- Ehrhardt D.W., Atkinson E.M., Long S.R. (1992) *Science*. V. 256, p. 998-1000.
- Ehrhardt D.W., Wais R., Long S.R. (1996) *Cell*. V. 85, p. 673-681.
- Evans I.J., Downie J.A. (1986) *Gene*. V. 43, p. 95-101.
- Faucher C., Maillet F., Vasse J., Rosenberg C., van Brussel A.A.N., Truchet G., Denarie J. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 5489-5499.

- Fellay R., Perret X., Viprey V., Broughton W.J., Brenner S. (1995) *Mol. Microbiol.* V. 16, p. 657-667.
- Fellay R., Rochepeau P., Relic B., Broughton W.J. (1995) Singh U.S., Singh R.P., Kohmoto K. (eds) *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases. Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases*. Pergamon/Elsevier Science Ltd, Oxford, p. 199-220.
- Felle H.H., Kondorosi E., Kondorosi A., Schultze M. (1995) *Plant J.* V. 7, p. 939-947.
- Felle H.H., Kondorosi E., Kondorosi A., Schultze M. (1996) *Plant J.* V. 10, p. 295-301.
- Fernandez-Lopez M., D'Haese W., Mergaert P., Verplancke C., Prome J.C., Van Montagu M., Holsters M. (1996) *Mol. Microbiol.*, V. 20, p. 993-1000.
- Finnie C., Dean G., Sutton J.M., Gehlani S., Downie J.A. (1996) Stacey G., Mullin B., Gresshoff P.M. (eds) *Advances in Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions*. p. 343-348.
- Finnie C., Hartley N.M., Findlay K.C., Downie J.A. (1997) *Mol. Microbiol.* V. 25, p. 135-146.
- Firmin J.L., Wilson K.E., Carlson R.W., Davies A.E., Downie J.A. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 10, p. 351-360.
- Folch-Mallol J.L., Marroqui S., Sousa C., Manyani H., Lopez-Lara I.M., van der Drift K.M.G.M., Havekamp J., Quinto C., Gil-Serrano A., Thomas-Oates J., Spalink H.P., Megias M. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 151-163.
- Freiberg C., Fellay R., Bairoch A., Broughton W.J., Rosenthal A., Perret X. (1997) *Nature*. V. 387, p. 394-401.
- Geelen D., Lcyman B., Mergaert P., Klarskov K., Van Montagu M., Geremia R.A., Holsters M. (1995) *Mol. Microbiol.* V. 17, p. 387-379.
- Geelen D., Mergaert P., Geremia R.A., Goormachtig S., Van Montagu M., Holsters M. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 9, p. 145-154.
- Geiger O., Spalink H.P., Kennedy E.P. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 2872-2878.
- Geiger O., Thomas-Oates J.E., Glushka J., Spalink H.P., Lugtenberg B.J.J. (1994) *J. Biol. Chem.* V. 269, p. 11090-11097.
- Geremia R.A., Mergaert P., Geelen D., Van Montagu M., Holsters M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 91, p. 2669-2673.
- Geurts R., Franssen H. (1996) *Plant Physiol.* V. 112, p. 447-453.
- Goethals K., Mergaert P., Gao M., Geelen D., Van Montagu M., Holsters M. (1992) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 5, p. 405-411.
- Gottfert M. (1993) *FEMS Microbiol. Rev.* V. 104, p. 39-63.
- Gottfert M., Lamb J.W., Gasser R., Semenza J., Hennecke H. (1989) *Mol. Gen. Genet.* V. 215, p. 407-415.
- Hanin M., Jabbouri S., Quesada-Vincens D., Freiberg C., Perret X., Prome J.-C., Broughton W.J., Fellay R. (1997) *Mol. Microbiol.* V. 24, p. 1119-1129.
- Inon de Iannino N., Pueppke S.G., Ugalde R.A. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 292-301.
- Jabbouri S., Fellay R., Talmont F., Kamalaprija P., Burger U., Relic B., Prome J.C., Broughton W.J. (1995) *J. Biol. Chem.* V. 270, p. 22968-22973.
- John M., Rohrig H., Schmidt J., Wieneke U., Schell J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, V. 90, p. 625-629.
- Journet E.P., Pichon M., Dedieu A., De Billy F., Truchet G., Baiker D. (1994) *Plant J.* V. 6, p. 241-249.
- Kamst E., Pilling J., Raamsdonk L.M., Lugtenberg B.J.J., Spalink H.P. (1997) *J. Bacteriol.* V. 179, p. 2103-2108.
- Kamst E., van der Drift K.M.G.M., Thomas-Oates J.E., Lugtenberg B.J.J., Spalink H.P. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 6282-6285.
- Kovacs L.G., Balatti P.A., Krishnan H.B., Pueppke S.G. (1995) *Mol. Microbiol.*, V. 17, p. 923-933.
- Kozik A., Heidstra R., Horvath B., Kulikova O., Tikhonovich I., Ellis T.H.N., Van Kammen A., Lie T.A., Bisseling T. (1995) *Plant Sci.*, V. 108, p. 41-49.
- Krishnan H.B., Pueppke S.G. (1991a) *Mol. Microbiol.* V. 5, p. 737-745.
- Krishnan H.B., Pueppke S.G. (1991) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 4, p. 512-520.
- Krishnan H.B., Pueppke S.G. (1992) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 5, p. 14-21.
- Krishnan H.B., Pueppke S.G. (1993) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 6, p. 107-113.
- Kurkdjian A.C. (1995) *Plant Physiol.* V. 107, p. 783-790.
- Laeremans T., Caluwaerts I., Verreth C., Rogel M.A., Vanderleyden J., Martinez-Romero E. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 492-500.
- Lerouge P. (1994) *Glycobiology*. V. 4, p. 127-134.
- Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Prome J.C., Denarie J. (1990) *Nature*. V. 344, p. 781-784.
- Lewin A., Cervantes E., Wong C.H., Broughton W.J. (1990) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 3, p. 317.
- Lewis-Henderson W.R., Djordjevic M.A. (1991) *Plant Mol. Biol.* V. 16, p. 515-526.
- Leyh T.S., Vogt T.F., Suo Y. (1992) *J. Biol. Chem.* V. 267, p. 10405-10410.
- Long S.R. (1996) *Plant Cell*. V. 8, p. 1885-1898.
- Lopez-Lara I.M., Blok-Tip L., Quinto C., Garcia M.L., Stacey G., Bloemberg G.V., Lamers G.E.M., Lugtenberg B.J.J., Thomas-Oates J.E., Spalink H.P. (1996b) *Mol. Microbiol.* V. 21, p. 397-408.
- Lopez-Lara I.M., van den Berg J.D.J., Thomas-Oates J.E., Glushka J., Lugtenberg B.J.J., Spalink H.P. (1995) *Mol. Microbiol.* V. 15, p. 627-638.
- Lopez-Lara I.M., van der Drift K.M.G.M., van Brussel A.A.N., Haverkamp J., Lugtenberg B.J.J., Thomas-Oates J.E., Spalink H.P. (1995a) *Plant Mol. Biol.* V. 29, p. 465-477.
- Lorquin J., Lortet G., Ferro M., Mear N., Dreyfus B., Prome J.-C., Boivin C. (1997) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 10, p. 879-890.
- Lorquin J., Lortet G., Ferro M., Mear N., Prome J.-C., Boivin C. (1997) *J. Bacteriol.* V. 179, p. 3079-3083.

- Lortet G., Mear N., Lorquin J., Dreyfus B., De Lajudie P., Rosenberg C., Boivin C. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 736-747.
- Luka S., Sanjuan J., Carlson R.W., Stacey G. (1993) *J. Biol. Chem.* V. 268, p. 27053-27059.
- Marie C., Barny M.A., Downie J.A. (1992) *Mol. Microbiol.* V. 6, p. 843-851.
- Marie C., Plaskitt K.A., Downie J.A. (1994) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 482-487.
- Martinez-Romero E. (1994) *Plant and Soil.* V. 161, p. 11-20.
- Mckay I.A., Djordjevic M.A. (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 59, p. 3385-3392.
- Meinhardt L.W., Krishnan H.B., Balatti P.A., Pueppke S.G. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 9, p. 17-29.
- Mergaert P., D'Haeze W., Geelen D., Prome D., Van Montagu M., Geremia R.A., Prome J.C., Holsters M. (1995) *J. Biol. Chem.* V. 270, p. 29217-29223.
- Mergaert P., D'Haeze W., Fernandez-Lopez M., Geelen D., Goethals K., Prome J.C., Van Montagu M., Holsters M. (1996) *Mol. Microbiol.* V. 21, p. 409-419.
- Mergaert P., Ferro M., D'Haeze W., Van Montagu M., Holsters M., Prome J.C. (1997) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 10, p. 683-687.
- Mergaert P., Van Montagu M., Prome J.C., Holsters M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 90, p. 1551-1555.
- Michiels J., Pelemans H., Vlassak K., Verreth C., Vanderleyden J. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 468-472.
- Mylona P., Pawlowski K., Bisseling T. (1995) *Plant Cell.* V. 7, p. 869-885.
- Nieuwkoop A.J., Banfalvi Z., Deshmane N., Gerhold D., Schell M.G., Sirotkin K.M., Stacey G. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 2631-2638.
- Olsthoom M.M.A., Lopez-Lara I.M., Petersen B.O., Bock K., Haverkamp J., Spaink H.P., Thomas-Gates J.E. (1997) *Biochemistry* (in press).
- Orgambide G.G., Lee J., Hollingsworth R.I., Dazzo F.B. (1995) *Biochemistry.* V. 34, p. 3832-3840.
- Ovtsyna A.O., Veldhuis A., Lopez-Lara I.M., Wijffes A.H.M., Quinto C., Geurts R., Bisseling T., Scott D.B., Tikhonovich I.A., Lugtenberg B.J.J., Spaink H.P. (1997) Legocki A., Bothelt Punier A. (eds.) *Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture*, p. 25-28.
- Philip-Hollingsworth S., Orgambide G.G., Bradford J.J., Smith D.K., Hollingsworth R.I., Dazzo F.B. (1995) *J. Biol. Chem.* V. 270, p. 20968-20977.
- Plazenet C., Refregier G., Demont N., Truchet G., Rosenberg C. (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 133, p. 285-291.
- Poupot R., Martinez-Romero E., Gautier N., Prome J.C. (1995a) *J. Biol. Chem.* V. 270, p. 6050-6055.
- Poupot R., Martinez-Romero E., Maillet F., Prome J.C. (1995b) *FEBS Letters.* V. 368, p. 536-540.
- Poupot R., Martinez-Romero E., Prome J.C. (1993) *Biochemistry* V. 32, p. 10430-10435.
- Price N.P.J., Relic B., Talmont E., Lewin A., Prome D., Pueppke S.G., Maillet F., Denarie J., Prome J.C., Broughton W.J. (1992) *Mol. Microbiol.* V. 6, p. 3575-3584.
- Price N.P.J., Talmont F., Wieruszkeski J.M., Prome D., Prome J.C. (1996) *Carbohydr. Res.* V. 289, p. 115-136.
- Prome J.C. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* V. 6, p. 671-678.
- Quesada-Vincens D., Fellay R., Nasim T., Broughton W.J., Jabbouri S. (1997) Abstract of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation, p. 106.
- Quesada-Vincens D., Fellay R., Nasim T., Viprey V., Burger U., Prome J.-C., Broughton W.J., Jabbouri S. (1997) *J. Bacteriol.* V. 179, p. 5087-5093.
- Quinto C., Wijffes A.H.M., Bloemberg G.V., Blok-Tip L., Lopez-Lara I.M., Lugtenberg B.J.J., Thomas-Oates J.E., Spaink H.P. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 94, p. 4336-4341.
- Relic B., Perret X., Estrada-Garcia M.T., Kopcinska J., Golinowski W., Krishnan H.B., Pueppke S.G., Broughton W.J. (1994) *Mol. Microbiol.* V. 13, p. 171-178.
- Ritsema T., Geiger O., van Dillewijn P., Lugtenberg B.J.J., Spaink H.P. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 7740-7743.
- Ritsema T., Wijffes A.H.M., Lugtenberg B.J.J., Spaink H.P. (1996) *Mol. Gen. Genet.* V. 251, p. 44-51.
- Rivilla R., Sutton J.M., Downie J.A. (1995) *Gene.* V. 161, p. 27-31.
- Roche P., Debelle F., Maillet F., Lerouge P., Faucher C., Truchet G., Denarie J., Prome J.C. (1991a) *Cell.* V. 67, p. 1131-1143.
- Roche P., Lerouge P., Ponthus C., Prome J.C. (1991b) *J. Biol. Chem.* V. 266, p. 10933-10940.
- Roche P., Maillet F., Plazenet C., Debelle F., Ferro M., Truchet G., Prome J.C., Denarie J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 93, p. 15305-15310.
- Rohrig H., Schmidt J., Wieneke U., Kondorosi E., Barlier I., Schell J., John M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 91, p. 3122-3126.
- Sadowsky M.J., Cregan P.B., Gottfert M., Sharma A., Gerhold D., Rodriguez-Quinones F., Keyser H.H., Hennecke H., Stacey G. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 88, p. 637-641.
- Sadowsky M.J., Lohrke S.M., Orf J. (1996) Legocki A.G. (eds) *Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture. Proc. 2-nd European Nitrogen Fixation Conference and NATO Advanced Research Network. OWN, Polish Acad. Sci. Poznan, Poland*, p. 41.
- Sadowsky M.J., Olson E.R., Foster V.E., Kosslak R.M., Verma D.P.S. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 171-178.
- Saier M.H., Tarn R., Reizer A., Reizer J. (1994) *Mol. Microbiol.* V. 11, p. 841-847.
- Sanjuan J., Carlson R.W., Spaink H.P., Bhat R.U., Barbour M.W., Glushka J., Stacey G. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 89, p. 8789-8793.
- Saxena I.M., Brown R.M., Fevre M., Geremia R.A., Henrissat B. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 1419-1424.

- Scheu A.K., Economou A., Hong G.F., Ghelani S., Johnston A.W.B., Downie J.A. (1992) *Mol. Microbiol.* V. 6, p. 231-238.
- Schlaman H.R.M., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 5486-5489.
- Schultze M., Kondorosi E., Ratet P., Buire M., Kondorosi A. (1994) *Inter. Rev. Cytol.* V. 156, p. 1-75.
- Schultze M., Quiclet-Sire B., Kondorosi E., Virelizier H., Glushka J.N., Endre G., Gero S.D., Kondorosi A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 89, p. 192-196.
- Schultze M., Staehelin C., Rohrig H., John M., Schmidt J., Kondorosi E., Schell J., Kondorosi A. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 92, p. 2706-2709.
- Schwedock J.S., Liu C.X., Leyh T.S., Long S.R. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 7055-7064.
- Schwedock J.S., Long S.R. (1989) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 2, p. 181-194.
- Schwedock J.S., Long S.R. (1990) *Nature.* V. 348, p. 644-647.
- Schwedock J.S., Long S.R. (1992) *Genetics.* V. 132, p. 899-909.
- Scott D.B., Young C.A., Collins-Emerson J.M., Terzaghi E.A., Rockman E.A., Lewis P.E., Pankhurst C.E. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 187-197.
- Scott K.F. (1986) *Nucl. Acids Res.* V. 14, p. 2905-2919.
- Semino C.E., Dankert M.A. (1994) *Cell Mol. Biol.* V. 40, p. 1029-1037.
- Shearman C.A., Rossen L., Johnston A.W.B., Downie J.A. (1986) *EMBO J.* V. 5, p. 647-652.
- Spaink H.P. (1995) *Annu. Rev. Phytopathol.* V. 33, p. 345-368.
- Spaink H.P. (1996) *Crit. Revs. Plant. Sci.* V. 15, p. 559-582.
- Spaink H.P., Bloemberg G.V., van Brussel A.A.N., Lugtenberg B.J.J., van der Drift K.M.G.M., Haverkamp J., Thomas-Oates J.E. (1995a) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 155-164.
- Spaink H.P., Lugtenberg B.J.J. (1994) *Plant Mol. Biol.* V. 26, p. 1413-1422.
- Spaink H.P., Sheeley D.M., van Brussel A.A.N., Glushka J., York W.S., Tak T., Geiger O., Kennedy E.P., Reinhold V.N., Lugtenberg B.J.J. (1991) *Nature.* V. 354, p. 125-130.
- Spaink H.P., Weinman J., Djordjevic M.A., Wijffelman C.A., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1989) *EMBO J.* V. 8, p. 2811-2818.
- Spaink H.P., Wijffes A.H.M., Lugtenberg B.J.J. (1995b) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 6276-6281.
- Spaink H.P., Wijffes A.H.M., van der Drift K.M.G.M., Haverkamp J., Thomas-Oates J.E., Lugtenberg B.J.J. (1994) *Mol. Microbiol.* V. 13, p. 821-831.
- Stacey G. (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 127, p. 1-9.
- Stacey G., Luka S., Sanjuan J., Banfalvi Z., Nieuwkoop A.J., Chun J.Y., Forsberg L.S., Carlson R. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 620-633.
- Staehelin C., Granado J., Muller J., Wiemken A., Mellor R.B., Felix G., Regenass M., Broughton W.J., Boller T. (1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 91, p. 2196-2200.
- Staehelin C., Schultze M., Kondorosi E., Mellor R.B., Boller T., Kondorosi A. (1994) *Plant J.* V. 5, p. 319-330.
- Staehelin C., Schultze M., Kondorosi E., Kondorosi A. (1995) *Plant Physiol.* V. 108, p. 1607-1614.
- Surin B.P., Downie J.A. (1988) *Mol. Microbiol.* V. 2, p. 173-183.
- Surin B.P., Downie J.A. (1989) *Plant Mol. Biol.* V. 12, p. 19-29.
- Surin B.P., Watson J.M., Hamilton W.D.O., Economou A., Downie J.A. (1990) *Mol. Microbiol.* V. 4, p. 245-252.
- Sutton J.M., Lea E.J.A., Downie J.A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 91, p. 9990-9994.
- Van der Drift K.M.G.M., Spaink H.P., Bloemberg G.V., van Brussel A.A.N., Lugtenberg B.J.J., Haverkamp J., Thomas-Oates J.E. (1996) *J. Biol. Chem.* V. 271, p. 22563-22569.
- Van Gijsegem F., Gough C., Zischek C., Niqueux E., Arlat M., Genin S., Barberis P., German S., Castello P., Boucher C. (1995) *Mol. Microbiol.* V. 15, p. 1095-1114.
- Van Rhijn P., Luyten E., Vlassak K., Vanderleyden J. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 74-77.
- Van Rhijn P., Vanderleyden J. (1995) *Microbiol. Rev.* V. 59, p. 124-142.
- Vazquez M., Santana O., Quinto C. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 8, p. 369-377.
- Waelkens F., Voets T., Vlassak K., Vanderleyden J., van Rhijn P. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 147-154.
- Yang G.P., Debelle F., Ferro M., Maillet F., Schiltz O., Vialas C., Savagnac A., Prome J.C., Denarie J. (1998) Kondorosi A., Newton W.E. (Eds.) *Biological Nitrogen Fixation for the 21-th Century*, pp. 185-188.

Реакции растений на Nod-факторы

Хадри А.-Е., Бисселинг Т.

I.	Введение.....	435
II.	Реакции, индуцируемые Nod-факторами.....	435
	II.A. Эпидермис.....	436
	II.A.1. Деформация корневых волосков.....	436
	II.A.2. Электрофизиологические реакции.....	439
	II.A.3. Экспрессия генов.....	440
	II.B. Клетки кортекса.....	440
	II.B.1. Формирование преинфекционных нитей.....	440
	II.B.2. Деление клеток.....	442
	II.C. Перицикл.....	443
	II.D. Реакции, индуцируемые у небобовых растений.....	444
III.	Структурно-функциональные отношения и механизмы рецепции Nod-факторов.....	444
	III.A. Процессинг Nod-факторов.....	444
	III.B. Рецепция Nod-факторов в эпидермисе.....	445
	III.C. Рецепция Nod-факторов в кортексе и перицикле.....	447
IV.	Ответы растений, сходные с защитными реакциями.....	447
V.	Литература.....	448

I. Введение

Nod-факторы являются сигнальными молекулами, которые продуцируются клубеньковыми бактериями (ризобиями), и их действия в большинстве случаев достаточно для индукции ранних этапов образования клубеньков (глава 20). Эти факторы состоят из хитиноподобного скелета (3-6 остатков N-ацетилглюкозамина), к которому присоединен остаток жирной кислоты (ацильная группа). В зависимости от вида и штамма ризобий, скелет Nod-фактора может быть декорирован различными заместителями. Длина и степень ненасыщенности жирной кислоты также варьируют.

Целью данной главы является анализ данных о различных реакциях растений-хозяев на действие Nod-фактора, о связи между его структурой и функциями, а также о возможных механизмах рецепции. Кроме того, в последней части дано краткое описание некоторых ответов, связанных с индукцией защитных реакций у бобовых в процессе взаимодействия с ризобиями.

II. Реакции, индуцируемые Nod-факторами

Nod-факторы вызывают морфологические и биохимические эффекты в различных тканях корня - эпидермисе, кортексе и перицикле (рис. 1). Мы рассмотрим эти эффекты, а также действие Nod-факторов на протопласты или суспензионные культуры клеток бобовых и небобовых растений (табл. 1).

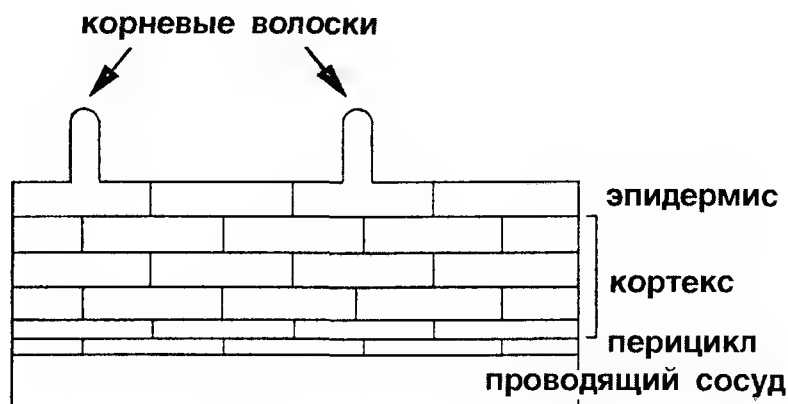


Рисунок 1. Схематическое изображение различных тканей корня, которые реагируют на появление Nod-факторов (детальное описание дано в таблице 1).

II.A. ЭПИДЕРМИС

В процессе колонизации корней ризобии прикрепляются к концам корневых волосков, вызывая их деформацию и скручивание. В результате корневые волоски приобретают форму “ручки пастушьего посоха”, в которой ризобии оказываются заключенными в складках колец. Здесь они проникают в корневой волосок путем частичного гидролиза его стенок с последующей инвагинацией плазматической мембраны (Turgeon, Bauer 1985; van Spronson et al., 1994). Перемещение нового материала растительных клеток вокруг впячивающейся мембраны приводит к формированию тубулярной структуры - инфекционной нити, которая используется бактериями для попадания внутрь корня (Kijne et al., 1992). Молекулярные механизмы, лежащие в основе скручивания корневых волосков и формирования инфекционной нити, до конца не выяснены, однако данные об этих процессах быстро накапливаются.

II.A.1. Деформация корневых волосков

Деформация и скручивание корневых волосков являются первыми морфологически различимыми изменениями, индуцируемыми ризобиями, и им предшествует быстрое изменение тока цитоплазмы. Очищенный Nod-фактор в низкой концентрации (10^{-12} М) достаточен для деформации корневых волосков (Lerouge et al., 1990; Spaink et al., 1991; Price et al., 1992; Sanjuan et al., 1992; Schultze et al., 1992; Mergeart et al., 1993; Heidstra et al., 1994), но в большинстве случаев скручивание наблюдается только тогда, когда присутствуют живые бактерии (Relic et al., 1993).

Деформация индуцируется только на определенной стадии развития корневых волосков (Heidstra et al., 1994, 1997; de Ruijter et al., 1997). В ходе их развития наблюдают три последовательные стадии, различающиеся в зависимости от локализации волосков вдоль корневой системы в трех смежных зонах (рис. 2). В зоне I корневые волоски находятся в стадии роста и характеризуются, как и другие клетки с концевым ростом, поляризованной цитоплазмой (Sievers, Schnepf, 1981). Поскольку в корневых волосках апикального района зоны I отсутствуют крупные органеллы, в том числе вакуоли, она называется чистой зоной (рис. 2B). Волоски первой зоны имеют обращенный фонтано-подобный ток цитоплазмы, в который не вовлекается цитоплазма в кончике волоска. На кончиках корневых волосков только первой зоны существует градиент ионов кальция, а также выявляется антиген, подобный спектрину, который идентифицируют при обработке гетерологичной сывороткой, полученной на спектрин цыплят. Антитела этой сыворотки узнают антигены, находящиеся на кончиках растущих корневых волосков, а также пылевых трубок и гриб-

ных гиф. Хотя природа спектрин-подобного антигена не установлена, строгая корреляция с растущими структурами делает его полезным молекулярным маркером.

В зоне II волоски находятся в стадии окончания роста и чистая зона больше не видна, ток цитоплазмы достигает кончика волоска, но он все еще является фонтано-подобным и обращенным. Около 80% корневых волосков в зоне II деформируются под действием Nod-фактора, тогда как корневые волоски в двух других зонах остаются неизменными (рис. 2С). В зоне III корневые волоски полностью сформированы и характеризуются присутствием крупных вакуолей, заполняющих большую часть волоска и окруженных тонким слоем кортикальной цитоплазмы (рис. 2В). Здесь наблюдается круговой ток цитоплазмы.

Инкубирование в течение 5-10 минут в присутствии 10^{-12} М NodRlv (Nod-фактора, вырабатываемого ризобиями из группы перекрестной инокуляции гороха — прим. переводчика) достаточно для начала деформации (Heidstra et al., 1994). Такие изменения начинаются со вздутия кончика корневого волоска и продолжаются в течение приблизительно 1 часа, а затем наблюдают возникновение цилиндрического отростка, локализованного на вздутии (рис. 2С; Heidstra et al., 1994). Этот отросток сходен с кончиком корневого волоска, поскольку чистая зона находится на его конце, сформирован градиент кальция и накапливается спектрин-подобный антиген. На основании этого предполагают, что деформация корневых волосков сопровождается реинициацией концевого роста волосков в зоне II, который может быть описан с помощью математической модели (van Batenburg et al., 1986). Процесс деформации корневых волосков может быть подавлен актиномицином Д и циклогексамидом, что указывает на необходимость транскрипции ДНК и белкового синтеза для этого процесса (Vijn et al., 1995a).

Деформация корневых волосков начинается со вздутия их кончиков. Поскольку оно требует синтеза РНК и белка, связано с формированием градиента кальция по периферии волоска, а также

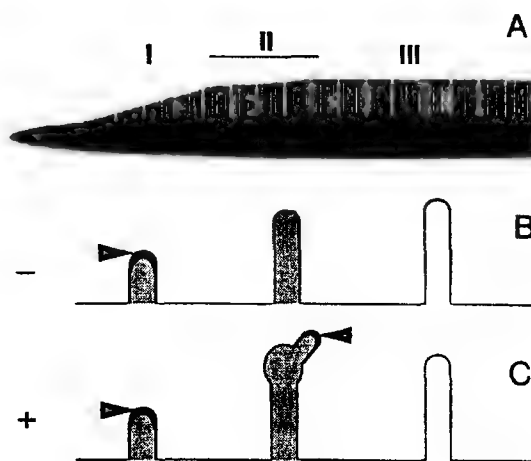


Рисунок 2. Взаимоотношения между стадиями развития корневых волосков и их чувствительностью к действию Nod-факторов.

(А) Зоны корня, соответствующие различным стадиям развития корневых волосков (зоны I — III).

(В) Вид волосков, принадлежащих к указанным выше (А) стадиям развития. В зоне I находятся растущие корневые волоски с полярно организованной цитоплазмой. Апикальный район корневых волосков в зоне I не содержит крупных органелл и поэтому получил название чистой зоны (черный цвет). Ток цитоплазмы обращенный и носит фонтанный характер (серый цвет). В зоне II корневые волоски не имеют чистой зоны и ток цитоплазмы достигает кончика волоска, однако все еще остается обращенного фонтанного типа (серый цвет). В зоне III находятся полностью развитые корневые волоски и ток цитоплазмы вращающегося типа. (-) — состояние до обработки Nod-фактором.

(С) Корневые волоски после обработки Nod-фактором (+). Волоски деформируются только в зоне II. Деформация начинается со вздутия кончика корневого волоска с последующим формированием отростка в месте вздутия. Ток цитоплазмы обращенного фонтанного типа (серый цвет), чистая зона выражена на кончике волоска и отмечена стрелкой.

Таблица 1. Реакции растений на Nod-факторы

Эффекты	Растения	Ссылки
Эпидермис корня		
Формирование новых корневых волосков	<i>Vicia</i> <i>Sesbania</i> <i>Medicago</i> <i>Lotus</i> <i>Phaseolus</i>	van Brussel et al., 1992 Mergaert et al., 1993 Roche et al., 1991b Lopez-Lara et al., 1995a Lopez-Lara et al., 1995b
Деформация, ветвление, скручивание корневых волосков	Многие бобовые	Schultze et al., 1994
Формирование колец Шенпарда	<i>Macroptilium</i>	Relic et al., 1993, 1994
Стимуляция движения цитоплазмы	<i>Vicia</i>	Heidstra et al., 1994
Подщелачивание цитоплазмы	<i>Medicago</i>	Felle et al., 1996
Деполаризация клеточных мембран	<i>Medicago</i>	Ehrhardt et al., 1992; Felle et al., 1995; Kurkdjian, 1995
Модуляция потоков протонов и ионов кальция	<i>Vicia</i> <i>Medicago</i>	Kurkdjian, 1995 Allen et al., 1994
Перенос кальция	<i>Medicago</i>	Ehrhardt et al., 1996
Индукция синтеза ранних нодулинов	<i>Pisum</i> , <i>Medicago</i>	Pichon et al., 1992; Horvath, et al., 1993; Cook et al., 1995
Кортекс корня		
Деформация клеток, связанная с действием этилена	<i>Vicia</i>	van Spronsen et al., 1995
Полярный рост клеток наружного кортекса	<i>Vicia</i>	van Brussel et al., 1992
Формирование преинфекционных нитей	<i>Vicia</i>	van Brussel et al., 1992
Формирование клубеньковых примордиев во внутреннем кортексе	<i>Vicia</i> <i>Medicago</i> <i>Trifolium</i> <i>Sesbania</i>	Spaink et al., 1991 Truchet et al., 1991 Bloemberg et al., 1995a Mergaert et al., 1993
Формирование клубеньковых примордиев в наружном кортексе	<i>Lotus</i> <i>Phaseolus</i> , <i>Acacia</i> <i>Glycine</i>	Lopez-Lara et al., 1995a Lopez-Lara et al., 1995b Stokkermans, Peters, 1994
Формирование зрелых клубеньков, содержащих проводящие пучки	<i>Medicago</i>	Truchet et al., 1991
Локальная индукция генов клеточного цикла	<i>Vicia</i>	Yang et al., 1994
Индукция синтеза ранних нодулинов	<i>Pisum</i> , <i>Vicia</i> <i>Medicago</i>	Horvath et al., 1993 Bauer et al. 1994; Journet et al., 1994; Vijn et al., 1995c
Перицикл корня		
Индукция синтеза нодулина ENOD40	<i>Vicia</i>	Kouchi et al., 1993; Yang et al., 1993; Matvienko et al., 1994; Vijn et al., 1995c
Корень в целом (эффект не был отнесен к определенному типу клеток)		
Усиление синтеза флавоноидов	<i>Vicia</i>	Spaink et al., 1991
Индукция гидролаз Nod-фактора	<i>Medicago</i>	Stachelin et al., 1995
Суспензионные клеточные культуры		
Индукция генов синтеза флавоноидов	<i>Medicago</i>	Savoure et al., 1994
Индукция генов клеточного цикла	<i>Medicago</i>	Savoure et al., 1994
Комплементация мутации по эмбриогенезу	<i>Daucus</i>	de Jong et al., 1993
Подщелачивание цитоплазмы	<i>Lycopersicum</i>	Stachelin et al., 1994
Культуры протопластов		
Индукция митозов	<i>Nicotiana</i>	Roehrig et al., 1995
Индукция гена, регулируемого ауксином	<i>Nicotiana</i>	Roehrig et al., 1995

с накоплением спектрин-подобного антигена, возможно, что вздутие, индуцируемое Nod-фактором, сопровождается клеточным ростом. Интересно отметить, что рост пыльцевых трубок можно блокировать агентами, связывающими кальций, а по прошествии определенного времени эти трубки возобновляют свой рост. При этом пыльцевые трубки сначала вздуваются на концах, после чего начинается их полярный рост (Miller et al., 1992). Поскольку этилен ускоряет формирование корневых волосков путем индукции концевой зоны у *Arabidopsis* (Tanimoto et al., 1995) и у бобовых (Heidstra et al., 1997), была изучена возможность участия этилена в инициации роста, опосредованной Nod-факторами. Оказалось, что этилен не нужен для опосредованной инициации роста корневых волосков и сам по себе не может индуцировать или блокировать этот процесс. Однако этилен не только участвует в формировании корневых волосков, но важен и для их нормального роста. В присутствии ингибиторов этилена (ионы серебра и AVG) растущие корневые волоски зоны I приобретали цитоархитектонику, характерную для зоны II (заканчивающийся рост) и были способны к деформации под действием Nod-фактора. Это наблюдение подтверждает жесткую корреляцию между фазой роста волоска и его способностью к деформации (Heidstra et al., 1997).

В некоторых случаях действие Nod-факторов, по всей видимости, выражается в накоплении этилена в растении-хозяине. Растения рода *Vicia* являются наиболее чувствительными к этилену или продуцируют большие его количества. У *V. sativa* Nod-факторы могут индуцировать формирование коротких толстых корней и этилен-зависимое вздутие клеток (Zaat et al., 1989). В некоторых случаях показано (табл. 1), что Nod-факторы могут индуцировать формирование корневых волосков, однако неясно, зависит ли эта индукция от этилена.

II.A.2. Электрофизиологические реакции

Nod-факторы индуцируют несколько быстрых реакций в эпидермисе корней, таких как подщелачивание цитоплазмы и деполяризация мембран (Ehrhardt et al., 1992; Kurkdjian, 1995; Felle et al., 1995, 1996), за которыми следуют резкие регулярные колебания концентрации ионов кальция в цитоплазме (Ehrhardt et al., 1996). Эти колебания подробно изучены на примере люцерны и проявляются при наномолярных концентрациях Nod-факторов. Подобные эффекты могут быть индуцированы и у других бобовых при использовании соответствующих Nod-факторов, как это показано для вики при использовании NodRlv (Ehrhardt et al., 1996). Тем не менее, Nod-фактор *R. meliloti* NodRm-IV (C16:2, S) (содержит четыре остатка глюкозамина, жирную кислоту с соотношением атомов углерода и ненасыщенных двойных связей 16:2, а также сульфатную группу — прим. переводчика), не способен индуцировать эти эффекты у небобовых растений, таких как томаты (Ehrhardt et al., 1992, 1996).

Nod-фактор *R. meliloti* индуцирует увеличение внутриклеточного pH в корневых волосках люцерны на 0.2-0.3 единицы уже через 15 секунд после добавления (Felle et al., 1995) и деполяризацию мембран — через 15-60 секунд (Ehrhardt et al., 1992; Felle et al., 1995). Проявление этих эффектов зависит от концентрации Nod-фактора (Ehrhardt et al., 1995, 1996; Kurkdjian, 1995). Их измерение в единичной растительной клетке показало, что подщелачивание сохраняется до тех пор, пока в среде присутствует Nod-фактор, тогда как продолжительность деполяризации ограничивается 15-30 минутами (Ehrhardt et al., 1992; Kurkdjian, 1995; Felle et al., 1995, 1996).

Индукция деполяризации мембраны в клетках эпидермиса зависит от стадии их развития, она индуцируется как в растущих, так и в только что появившихся корневых волосках (Ehrhardt et al., 1992; Kurkdjian, 1995; Felle et al., 1995). Клетки эпидермиса, которые не сформировали корневые волоски, так же как и старые волоски, не способны к проявлению описанных эффектов (Kurkdjian, 1995). Несмотря на это, эпидермальные клетки, не содержащие корневых волосков, но находящиеся в зоне их образования, могут реагировать на Nod-факторы (Felle et al., 1995). Остается неясным, в каком типе эпидермальных клеток и на какой стадии развития могут проявляться колебания концентрации кальция и подщелачивание.

У *R. meliloti* Nod-фактор индуцирует регулярные колебания концентрации свободного кальция в корневых волосках, особенно в участках цитоплазмы, находящихся вблизи ядра (Ehrhardt et al., 1996). Эти осцилляции возникают через 9 минут и сохраняются в среднем 60 минут после добавления Nod-фактора. Хотя кинетические характеристики этих эффектов не были изучены од-

новременно в одной клетке, представляется вероятным, что подщелачивание и деполяризация мембран предшествуют колебаниям концентрации кальция. Однако неизвестно, являются ли эти эффекты причинно связанными между собой.

II.A.3. Экспрессия генов

Несколько генов, активность которых индуцируется в корневом эпидермисе под действием Nod-факторов, были выявлены, клонированы и охарактеризованы. Примерами таковых являются *ENOD5*, *ENOD12*, *Mtrip1* и *VsLb1*, активность которых индуцируется через несколько часов после добавления Nod-факторов к корням в наномолярных концентрациях (Horvath et al., 1993; Journet et al., 1994; Cook et al., 1995; Heidstra et al., 1997).

ENOD5 и *ENOD12* – пролин-богатые белки, которые, возможно, локализируются в клеточной стенке. Присутствуют ли они в стенках инфекционной нити – неизвестно (Scheres et al., 1990a, 1990b).

Продукт гена *Mtrip1* является пероксидазой, функция которой неясна (Cook et al., 1995). У вики экспрессия гена *VsLb1* предшествует экспрессии *ENOD5* и *ENOD12* (Heidstra et al., 1997). Этот ген кодирует леггемоглобин, и его экспрессия резко активизируется на более поздних стадиях развития клубеньков. Функция, выполняемая *VsLb1* в эпидермальных клетках, неясна.

Использование методики сравнения РНК дало возможность клонировать ряд новых генов нодулинов. Можно предполагать, что среди них окажутся гены, пригодные для использования в качестве маркеров действия Nod-факторов (Heidstra et al., 1997). Наиболее подробно экспрессия генов *Mtrip1* и *ENOD12* изучена в эпидермальных клетках люцерны. Эти гены активируются в достаточно обширной зоне корня (Pichon et al., 1992; Cook et al., 1995): экспрессия начинается сразу за корневым чехликом и распространяется вплоть до зоны формирования корневых волосков. Эти данные, а также о сведения о деполяризации мембран показывают, что эпидермальные клетки с волосками или без них способны реагировать на Nod-фактор. Более того, данные об экспрессии нодулинов показывают, что даже эпидермальные клетки в состоянии, предшествующем возникновению корневых волосков, восприимчивы к Nod-фактору.

Индукция генов ранних нодулинов, таких как *ENOD12*, требует синтеза белка *de novo* (Vijn et al., 1995a). Поскольку экспрессия таких генов является относительно поздним этапом в последовательности событий, индуцируемых Nod-факторами в эпидермисе, возможно, что каскад сигналов, возникающих под действием Nod-факторов и ведущих к экспрессии указанных генов, достаточно сложен. Поэтому гены, которые индуцируются сразу же после воздействия Nod-факторов, могут быть использованы в качестве маркеров ранних сигнальных процессов, запускаемых Nod-факторами в эпидермисе.

II.B. КЛЕТКИ КОРТЕКСА

В дополнение к эффектам, индуцируемым в эпидермисе, Nod-факторы вызывают изменения в клетках кортекса корня (табл. 1). К их числу относится формирование толстых коротких корней (вздутие клеток, обусловленное действием этилена; van Spronsen et al., 1995), а также активация кортикальных клеток, следствием которой является накопление гранул крахмала (Ardourel et al., 1994). Поскольку эти поздние ответы не представляются существенными для инфекции или формирования примордиев, их описание не приводится. Мы рассмотрим формирование преинфекционных нитей и деление кортикальных клеток.

II.B.1. Формирование преинфекционных нитей

У бобовых, которые образуют недетерминированные клубеньки (люцерна, горох), их примордии формируются во внутреннем кортексе, и для колонизации примордиев инфекционные нити должны проникнуть через наружный кортекс. До проникновения инфекционных нитей клетки наружного кортекса претерпевают ряд морфологических изменений: ядра перемещаются к центру клетки, микротрубочки цитоплазмы реорганизуются, формируя радиально ориентированные конические структуры – цитоплазматические мостики, сходные с фрагмопластом (Kijn et al., 1992).

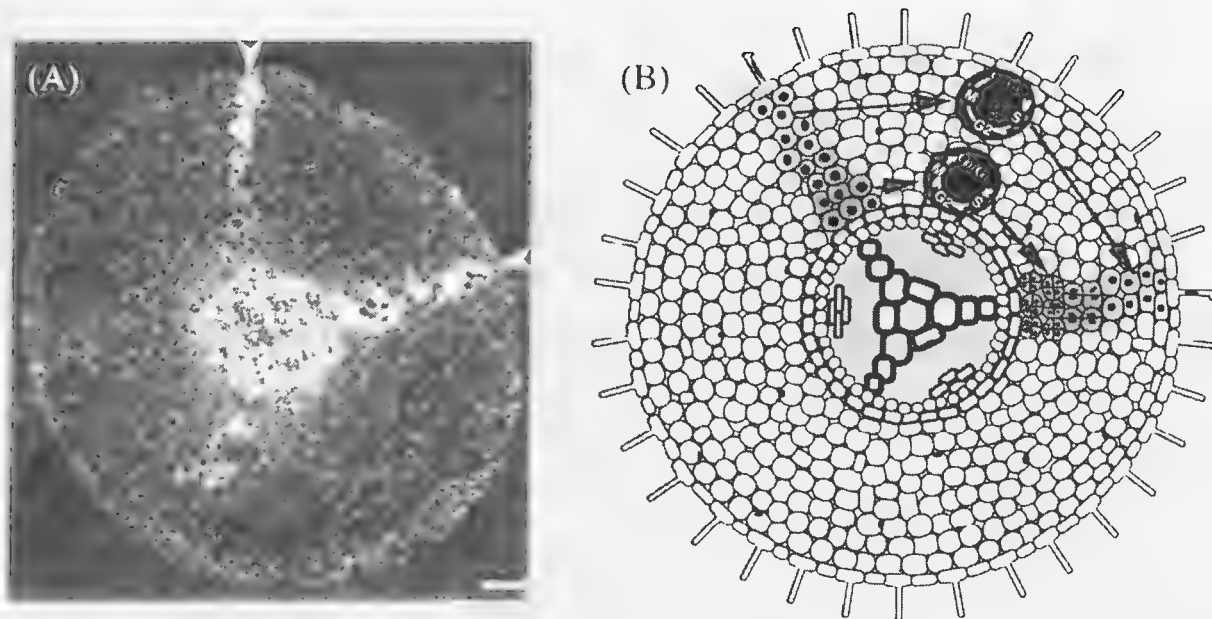


Рисунок 3. Активация клеток кортекса при формировании недетерминированных клубеньков.

(А) Темнопольная микрофотография представляет поперечный срез корней гороха спустя один день после инокуляции *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Срез гибридизирован с пробой на ген гистона *H4*. Перед местами инфекции, указанными стрелками, транскрипты *H4* локализируются в пределах узкого слоя кортикальных клеток. Гибридизационный сигнал маркирован зернами серебра. Инфекционные сайты находятся напротив пор протоксилемы (стрелка). Черта разрезания соответствует 50 μm .

(В) Схематическое изображение среза корня гороха, представляющее реактивацию деления кортикальных клеток после обработки Nod-фактором или инокуляции ризобиями. Клетки наружного кортекса, окрашенные светло-серым цветом, заново вступают в клеточный цикл, переходя из стадии G0/G1 в S и останавливаются на стадии G2. Однако, клетки внутреннего кортекса, обозначенные темно-серым цветом, проходят весь клеточный цикл, делятся и формируют клубеньковые примордии. Активируемые клетки расположены напротив пор протоксилемы, очерченных жирной черной линией.

Инфекционные нити проходят сквозь кортикальные клетки через эти мостики, которые получили название преинфекционных нитей (Van Brussel et al., 1992).

Хотя клетки наружного кортекса, формирующие преинфекционные нити, не делятся, индуцируемые в них изменения сходны с таковыми в клетках, проходящих клеточный цикл. В опытах по гибридизации *in situ* показано (Yang et al., 1994), что в узком слое клеток наружного кортекса экспрессируется специфичный для стадии S клеточного цикла ген гистона *H4* (рис. 3А), хотя гены циклинов, которые экспрессируются при переходе клеток из стадии G2 в М, не активируются. Таким образом, клетки, которые формируют преинфекционные нити, возвращаются в клеточный цикл, однако они останавливаются, по всей видимости, на стадии G2, тогда как клетки внутреннего кортекса проходят весь цикл и формируют клубеньковые примордии (рис. 3В). Это позволяет предположить, что часть генетической системы, контролирующей инфекционный процесс, ведет происхождение от системы клеточного деления. Очищенный Nod-фактор индуцирует образование преинфекционных нитей, однако инфекционные нити в отсутствии ризобий не образуются (van Brussel et al., 1992). Преинфекционные нити образуются в наружном кортексе, клетки которого формируют полярные выросты, в основном напротив тех участков внутреннего кортекса, где возникают примордии (van Brussel et al., 1992). Поэтому предполагается, что образование преинфекционных нитей связано с появлением полярного типа роста (van Brussel et al., 1992; van Spronsen et al., 1994).

II.B.2. Деление клеток

Во время реактивации ризобиями митотических делений клеток кортекса начинают экспрессироваться гены, контролирующие клеточный цикл, такие как *cdc2* и циклины (Yang et al., 1994). Кроме того, отмечается экспрессия некоторых генов нодулинов, которая отличает примордии клубеньков от корневых или стеблевых меристем. Примерами таких нодулинов являются *ENOD12* (Scheres et al., 1990a), *Gm93* (Kouchi, Hata, 1993), *ENOD40* (Kouchi, Hata, 1993; Yang et al., 1993; Asad et al., 1994; Matvienko et al., 1994), *MtPRP4* (Wilson et al., 1994), которые активируются во всех меристематических клетках. Кроме того, в клетках перицикла напротив делящихся кортикальных клеток индуцируется активность гена *ENOD40* (Kouchi, Hata, 1993; Yang et al., 1993; Asad et al., 1994). Другой ранний нодулин — *ENOD5* транскрибируется только в тех клетках, которые содержат бактерии (Scheres et al., 1990b).

Присутствие Nod-факторов является достаточным для индукции деления кортикальных клеток (Spaink et al., 1991; Truchet et al., 1991; Relic et al., 1993). В образующихся примордиях активируются гены ранних нодулинов — *ENOD12* и *ENOD40* (Vijn et al., 1993). У некоторых растений очищенные Nod-факторы индуцируют даже образование клубеньков (Truchet et al., 1991; Mergaert et al., 1993; Stokkermans, Peters, 1994).

Интересно, что только некоторые кортикальные клетки восприимчивы к действию Nod-факторов. У субтропических бобовых (соя, фасоль) активируются клетки наружного кортекса, а у бобовых умеренных широт (горох, вика, люцерна) — клетки внутреннего кортекса, особенно те, которые локализируются напротив пор протоксилемы (Kijne, 1992). Механизм, который обеспечивает восприимчивость кортикальных клеток к индукции делений, неизвестен. Долгое время считалось, что эта восприимчивость связана с остановкой митотического цикла на стадии G2 (Wipf, Cooper, 1938; Verma, 1992). Однако использование генов, специфичных для разных стадий клеточного цикла, в качестве проб при ДНК-гибридизации *in situ* показал, что это не так (Yang et al., 1994). Расположение реагирующих кортикальных клеток позволяет высказать некоторые предположения относительно возможного механизма. На рисунке 3А видно, что после воздействия ризобий активируются только узкие слои кортикальных клеток, экспрессируя ген гистона *H4*. В это время кончики инфекционных нитей, где происходит освобождение Nod-фактора, все еще находятся в эпидермисе, а следовательно Nod-фактор действует на расстоянии.

Уже достаточно давно было показано, что спиртовая вытяжка из стебля может индуцировать клеточные деления в эксплантах клеток кортекса корней гороха в присутствии ауксина и цитокинина (Libbenga et al., 1973). Фактор, который вызывает данный феномен (стеблевой фактор), как предполагается, освобождается из пор протоксилемы. Этот фактор был очищен, и оказалось, что он представляет собой уридин (Smith et al., 1993). Стеблевой фактор может определять восприимчивость к индукции делений кортикальных клеток, расположенных напротив пор протоксилемы (Smith et al., 1993). Показано, что выделение этилена является источником позиционной информации, определяющей расположение клубеньковых примордиев (Heidstra et al., 1997). Этилен, скорее всего, синтезируется в перицикле напротив пор флоэмы, поскольку ген, кодирующий АСС-оксидазу (фермент, осуществляющий последнюю реакцию в биосинтезе этилена), специфически экспрессируется в этой части перицикла. Более того, при ингибировании биосинтеза этилена количество клубеньков, формирующихся напротив пор флоэмы, возрастает. Эти данные показывают, что присутствие этилена может подавлять деление клеток кортекса напротив поры флоэмы (Heidstra et al., 1997).

Возможность реактивации митотических делений определенным Nod-фактором зависит от растения-хозяина. Клубеньковые бактерии, которые индуцируют деления во внутренних слоях кортекса (например, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* или *R. meliloti*), синтезируют Nod-фактор с остатком высоконасыщенной жирной кислоты, тогда как бактерии, которые активируют митозы в наружном кортексе (*Bradyrhizobium japonicum*), продуцируют в основном Nod-фактор с C18:1 ацильной группой. Группа высоконасыщенной жирной кислоты может иметь важное значение для индукции делений во внутреннем кортексе. Например, только те факторы *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, которые имеют C18:4 группы, вызывают формирование клубеньковых примордиев у

вики (Van Brussel et al., 1992). Узнается ли высоконенасыщенная жирная кислота специфическим рецептором или же она необходима для перемещения Nod-фактора во внутренний кортекс — пока неизвестно.

II.C. ПЕРИЦИКЛ

Когда растения инокулированы ризобиями или обработаны Nod-фактором, наблюдается быстрый ответ в перицикле: ген *ENOD40* активируется в этой ткани через три часа после инокуляции. Это представляется удивительным, поскольку, в отличие от латеральных корней, клубеньки из этой ткани не формируются. Более того, Nod-факторы не индуцируют структурных изменений в клетках перицикла на ранних стадиях формирования клубеньков. Какова же функция *ENOD40* во время прохождения ранних стадий развития клубенька?

Ген *ENOD40* был клонирован как у бобовых, так и у небобовых растений, он кодирует белок, состоящий из 10–13 аминокислот (Kouchi, Hata, 1993; Yang et al., 1993; Crespi et al., 1994; Matvienko et al., 1994; van de Sande et al., 1996; рис. 4). Интересно, что у генов *ENOD40* из различных растений имеются консервативные последовательности на 3' нетранслируемом конце, и нельзя исключить того, что функционально активным продуктом *ENOD40* является РНК, хотя данных для такого утверждения пока недостаточно (Crespi et al., 1994; Matvienko et al., 1994; van de Sande et al., 1996).

Функция белка *ENOD40* была изучена при переносе его гена в табак и люцерну. Усиленная экспрессия гена *ENOD40* из сои вызывала у табака формирование дополнительных побегов (van de Sande et al., 1996), тогда как экспрессия в нехарактерных тканях у *Medicago* нарушала эмбриогенез и регенерацию (Crespi et al., 1994). Для изучения активности белка *ENOD40* было использовано деление протопластов. Протопласты “дикого типа” делятся с оптимальной частотой 50% при концентрации кинетина 0.9 мМ и ауксина (NAA) 5.5 мкМ. При больших концентрациях NAA эффективность делений заметно падает. Протопласты, обработанные белком *ENOD40* или проявляющие экспрессию гена *ENOD40*, способны делиться с оптимальной частотой при высоких концентрациях NAA. Таким образом, белок *ENOD40* определяет устойчивость протопластов к высоким концентрациям ауксина (van de Sande et al., 1996).

Поскольку ген *ENOD40* активируется перед делением кортикальных клеток, было высказано предположение о его участии в контроле клеточных делений в кортексе. Позднее Crespi с коллегами показали, что сверхэкспрессия гена *MsENOD40* действительно достаточна для запуска деления кортикальных клеток у люцерны. Пентамеры хитина, которые не способны индуцировать деформацию корневых волосков или кортикальные деления, вызывают накопление матричной РНК *ENOD40* (Minami et al., 1996).

Для определения механизма, посредством которого Nod-факторы активируют деления клеток кортекса, были предприняты исследования с соединениями, которые имитируют его митогенную активность. Две линии доказательств свидетельствуют о том, что Nod-факторы вызывают изменение в балансе ауксинов и цитокининов. Как цитотокнины (Cooper, Long, 1994), так и

PsENOD40	MKFLCWQKSIHGS
MsENOD40	MKLLCWQKSIHGS
MtENOD40	MKLLCWEKSIHGS
GmENOD40-1	MEL.CWQTSIHGS
GmENOD40-2	MEL.CWLTTIHGS
NtENOD40	M...QWDEAIHGS

Рисунок 4. Аминокислотные последовательности белков *ENOD40* гороха *Pisum sativum* — Ps (Matvienko et al., 1994), люцерны *Medicago sativa* — Ms и *M. truncatula* — Mt (Asad et al., 1994; Crespi et al., 1994), сои *Glycine max* — Gm (Yang et al., 1993) и табака *Nicotiana tabacum* — Nt (van de Sande et al., 1996).

соединения, которые блокируют полярный транспорт ауксинов (NPA и TIBA; Hirsch et al., 1989), индуцируют формирование клубенок-подобных структур, в которых отмечается экспрессия ранних нодулинов.

Поскольку экспрессия гена *ENOD40* достаточна для того, чтобы вызвать сходный с гормональным эффект у табака, а также запустить клеточные деления, можно предположить, что она вызывает изменения баланса фитогормонов в кортикальных клетках. Изучение протопластов табака также показало, что пептид ENOD40 опознается клетками (van de Sande et al., 1996), и поэтому вероятно, что на поверхности протопластов имеется рецептор Nod-фактора. Это делает весьма правдоподобной гипотезу об участии *ENOD40* в межклеточной передаче сигналов. Поскольку транскрипция гена *ENOD40* в перицикле предшествует клеточным делениям, привлекательным является предположение о том, что продукт гена *ENOD40*, будучи выработанным в перицикле, затем мигрирует во внутренний кортекс.

II.D. РЕАКЦИИ, ИНДУЦИРУЕМЫЕ У НЕБОБОВЫХ РАСТЕНИЙ

Nod-факторы клубеньковых бактерий являются специализированными молекулами, которые не были описаны у других организмов и, по-видимому, используются исключительно во взаимодействии ризобий и растений. Тем не менее, многие данные показывают, что Nod-факторы узнаются растениями, которые не способны формировать клубеньки с ризобиями. Например, фенотип клеток мутантной линии моркови, которая потеряла способность к соматическому эмбриогенезу, может быть нормализован Nod-фактором (De Jong et al., 1993). Показано также, что экспрессия генов клубенькообразования ризобий бактерий *nodA* и (или) *nodB*, перенесенных в табак, изменяет его развитие (Schmidt et al., 1993). Более того, очищенный и синтетический Nod-факторы индуцируют деления протопластов табака, активируют ауксин-зависимые промоторы и индуцируют экспрессию гена *axi1*, вовлеченного в действие ауксина (Rohrig et al., 1995). В культуре клеток томата Nod-фактор стимулирует быстрое и обратимое подщелачивание среды (Stachelin et al., 1994). Поскольку клетки небобовых растений способны узнавать Nod-фактор, возникает предположение о его сходстве с сигналами, которые синтезируются самими растениями, хотя такого рода молекулы пока не идентифицированы.

III. Структурно-функциональные отношения и механизмы рецепции Nod-факторов

Как мы показали ранее, Nod-факторы вызывают различные реакции в эпидермисе, кортексе и перицикле. На основе этих реакций были разработаны методы полуколичественной оценки действия Nod-факторов, которые позволили начать изучение механизмов их рецепции. Ниже мы рассмотрим следующие вопросы: 1) интактный или модифицированный растительными ферментами Nod-фактор индуцирует симбиотические реакции? 2) существует ли более чем один рецептор Nod-фактора? 3) контактируют ли клетки кортекса непосредственно с Nod-фактором или же в эпидермисе синтезируются вторичные посредники его действия?

III.A. Процессинг Nod-факторов

При добавлении Nod-факторов к корням они претерпевают деградацию, вследствие чего в среде или на корнях образуются молекулы, содержащие 2-3 остатка сахаров. Возможно, эти молекулы продуцируются хитиназами, секретируемыми растением. Однако такой деградированный Nod-фактор в 1000 раз менее активно индуцирует деформацию корневых волосков, чем фактор с 4-5 сахарами (Heidstra et al., 1994; Stachelin et al., 1994a). Очевидно, что продукты деградации Nod-фактора не участвуют в деформации корневых волосков.

Исследования по деградации выявили четкие различия в скорости разложения различных Nod-факторов. Сравнение скоростей деградации для NodRlv-V(C18:4) и NodRlv-IV(C18:4) показало, что тетрамер более стабилен, чем пентамер (Heidstra et al., 1994). Очищенная эндохитиназа люцерны способна гидролизовать продуцируемые *R. meliloti* Nod-факторы со структурами NodRm-

V, NodRm-V(S), NodRm-IV, но не со структурой NodRm-IV(S) (Stachelin et al., 1994). Опыты *in vivo* показали, что NodRm-IV(S) также подвергается разрушению, но с гораздо меньшей скоростью, чем несulfатированный NodRm, а значит заместители на редуцирующем конечном сахаре могут обеспечить защиту от действия хитиназ или гидролаз, специфически разрушающих Nod-фактор (Stachelin et al., 1994). Однако, такие реакции как подщелачивание (Felle et al., 1996), деполяризация мембран (Felle et al., 1995) и деформация корневых волосков (Heidstra et al., 1994) требуют лишь кратковременного воздействия Nod-фактора. Поэтому его деградация, по-видимому, не имеет значения для этих реакций и они индуцируются интактным Nod-фактором. Справедливо ли это для реакций, индуцируемых на более поздних стадиях взаимодействия, остается неизвестным.

С использованием методики обстрела микрочастицами было показано, что хитиновые фрагменты достаточны для индукции клеточных делений (Spaink et al., 1994) и экспрессии гена *ENOD40* (Minami et al., 1996). Это может означать, что хитиновый скелет является активной частью Nod-фактора в отношении индукции клеточных делений.

III.B. Рецепция Nod-факторов в эпидермисе

В наномолярных концентрациях Nod-факторы способны вызывать различные реакции в эпидермисе. Это позволяет предположить, что в их восприятие вовлечены высокоафинные рецепторы, однако данные в пользу этой гипотезы пока отсутствуют. Многие реакции, индуцируемые в эпидермисе, были использованы в качестве биотестов для определения связи структуры и функций Nod-факторов. Такие исследования проводились с различными бобовыми, но только для *Medicago sativa* была создана более или менее полная картина.

R. meliloti, микросимбионт *Medicago*, преимущественно продуцирует Nod-факторы с тетрамерным N-ацетил-глюкозаминовым скелетом, C16:2 ацильной цепью, O-ацетильным замещением на нередуцирующем сахарном остатке и O-сульфатным замещением на редуцирующем остатке (он обозначается NodRm-IV(Ac, C16:2, S)). С использованием мутантов *R. meliloti* и Nod-факторов изучена роль различных замещений и изменений структуры ацильной цепи в индукции реакций эпидермальных клеток люцерны (Roche et al., 1991; Truchet et al., 1991; Schultze et al., 1992; Arbourel et al., 1994; Journet et al., 1994; Kurkdjian, 1995; Felle et al., 1995, 1996). Связь между структурой и функциями Nod-факторов показана при анализе деформации корневых волосков, индукции гена *ENOD12*, деполяризации мембран корневых волосков, подщелачивания цитоплазмы и формирования инфекционных нитей. Эти исследования показали, что ответы, индуцируемые Nod-фактором *R. meliloti* у люцерны, можно разделить на три группы (табл. 2).

Первая группа ответов касается реакции цитоплазмы корневого волоска. Фактор NodRm-IV(C16:2, S) является наиболее активным индуктором увеличения pH, тогда как несulfатированный Nod-фактор вызывает эти реакции лишь при гораздо больших концентрациях (Felle et al., 1996). Присутствие O-ацетильной группировки на нередуцирующем концевом остатке не является необходимым (Felle et al., 1996), но присутствие ацильной цепи существенно, хотя ее структура, по-видимому, не имеет значения.

Вторая группа ответов включает деформацию корневых волосков, деполяризацию мембран и экспрессию гена *ENOD12*. Ни O-ацетильные замещения, ни структура ацильной цепи не существенны для этих ответов, хотя присутствие жирной кислоты являются необходимым (Heidstra et al., 1994; Journet et al., 1994). Сульфатирование оказывает сильный эффект на способность Nod-фактора вызывать деформацию корневых волосков, экспрессию *ENOD12* и деполяризацию мембран. Десульфатирование Nod-фактора снижает его активность в отношении этих реакций по крайней мере в 1000 раз (Journet et al., 1994; Felle et al., 1995).

Таким образом, разница в специфике реакций первой и второй групп заключается в значении сульфатирования для их протекания. Несульфатированный Nod-фактор индуцирует только подщелачивание цитоплазмы корневого волоска, тогда как сульфатированный Nod-фактор индуцирует в этих же волосках как подщелачивание, так и деполяризацию мембран (Felle et al., 1996). Уровень ненасыщенности ацильной цепи может быть значимым для деполяризации мембран, однако нельзя исключить того, что этот уровень определяет растворимость Nod-фактора (Felle et al., 1995).

Таблица 2. Связь структуры Nod-фактора и реакций, вызываемых в эпидермисе

Реакции	Число остатков глюкозамина	О-замещения на редуцирующем конце	N-ацильная цепь		О-замещения на редуцирующем конце, О-ацетат	Ссылки
			Сульфатирование	Структура		
Группа 1						
Подщелачивание цитоплазмы	+	-	+	-	-	A
Группа 2						
Деполаризация мембраны	+	+	-	-	-	B
Деформация корневых волосков	+	+	+	-	-	C
Индукция синтеза нодулина ENOD12	Нд	+	+	-	-	D
Группа 3						
Формирование инфекционных нитей	Нд	+	+	+	+	E

+ - важная роль в индукции данного ответа, Нд - нет данных.

A - Felle et al., 1996; B - Kurkdjian, 1995; Felle et al., 1995; C - Lerouge et al., 1990; D - Journet et al., 1994; E - Ardourel et al., 1994

Третья группа эффектов включает формирование инфекционных нитей. Оно наиболее тесно связано со структурно-функциональными особенностями Nod-фактора, поскольку требует как сульфатирования, так и ацетильных замещений, а также присутствия ненасыщенной ацильной цепи. Штаммы *R. meliloti*, мутантные по генам *nodE* или *nodL*, продуцируют Nod-фактор, который не несет соответствующей ненасыщенной жирной кислоты или у него отсутствует, соответственно, О-ацетильная группа. Эти мутанты индуцируют достоверно уменьшенное число инфекционных нитей (Ardourel et al., 1994). Двойной мутант (*nodE/nodL*), секретирующий Nod-фактор без О-ацетильной группы и с C18:1 жирной кислотой, лишен способности индуцировать образование инфекционных нитей (Ardourel et al., 1994). Штаммы *R. meliloti*, мутантные по гену *nodH* и продуцирующие только несulfатированный Nod-фактор, также не вызывают формирования инфекционных нитей (Roche et al., 1991a). Эта разница была четко продемонстрирована, когда на одних и тех же корневых волосках изучили подщелачивание и деполаризацию. Интересно, что те растительные реакции, которые зависят от длины хитинового скелета, также требуют сульфатного замещения. Например, длина хитинового скелета очень важна для деполаризации мембран и деформации корневых волосков. Пентамерный NodRm-V (C16:2, S) активен в более высоких концентрациях, чем тетрамер NodRm-IV (C16:2, S) (Felle et al., 1995). Это показывает, что расстояние между нередуцирующим концом и сульфатной группой на редуцирующем конце является значимым и рецептор Nod-фактора опознает оба конца молекулы.

Для объяснения того, каким образом различия в молекулярной структуре определяют варьирование реакций растений, было выдвинуто предположение об участии более чем одного рецептора в узнавании Nod-фактора в клетках эпидермиса (Ardourel et al., 1994; Felle et al., 1995, 1996). Выявление трех групп реакций свидетельствуют о возможности участия даже трех рецепторов: одного для несulfатированного Nod-фактора и двух для сульфатированного. Один из рецепторов, специфичный для сульфатированных Nod-факторов, узнает О-сульфатное замещение, О-ацетильное замещение и специфическую ацильную группу (C16:2). Поскольку этот рецептор, по всей видимости, участвует в инициации роста инфекционных нитей, он был назван воспринимающим рецептором (Ardourel et al., 1994). Строгая регуляция инфекционного процесса подтверждается исследованиями аллели *sym-2*, выявленной у афганских форм гороха (Lie, 1984; Davis et al., 1988; Kozik et al., 1995). Штаммы *R. leguminosarum* bv. *viceae*, несущие ген *nodX*, способны инокулиро-

вать эти формы, а также и другие генотипы гороха, гомозиготные по аллели *sym-2*. Белок NodX является О-ацетилтрансферазой, которая участвует в синтезе Nod-фактора с дополнительной ацетильной группой на редуцирующем сахаре пентамерного фактора NodRiv (Clark et al., 1991; Firmin et al., 1993). Ризобии, не содержащие ген *nodX*, индуцируют у афганских горохов деформацию корневых волосков, но инфекционные нити отсутствуют (Geurtz et al., 1997).

Гипотеза о том, что в эпидермисе корней функционирует более чем один рецептор Nod-факторов, подтверждается данными о подщелачивании цитоплазмы в корневых волосках люцерны при обработке как сульфатированным, так и несulfатированным Nod-факторами (Felle et al., 1995, 1996): повторная обработка не вызывает усиления реакции, что было объяснено насыщением рецептора. Когда несulfатированный Nod-фактор применялся первым в низких концентрациях, с последующей обработкой сульфатированным Nod-фактором (или наоборот), подщелачивание наступало с каждым последующим добавлением Nod-фактора. Это показывает, что реакция подщелачивания является следствием не различного взаимодействия Nod-фактора с одним и тем же рецептором, а реакций с разными рецепторами (Felle et al., 1996).

Гипотеза о нескольких рецепторах является относительно простым путем объяснения вышеописанных данных. В корнях *Medicago truncatula* найден только один белок, связывающий как сульфатированный и несulfатированный Nod-фактор (Bono et al., 1995). В экстракте микросомной фракции культуры клеток *M. varia* обнаружены два класса сайтов для связывания Nod-фактора NodRm (Ac, S, C16:2), которое было обратимым и насыщаемым (Niebel et al., 1997). Анализ связывания показал, что его сайты могут иметь высокое или низкое сродство к NodRm (Niebel et al., 1997), причем сайт с низким сродством сходен с сайтом, выявленным у *M. truncatula* (Bono et al., 1995). Однако неизвестно, возможно ли дифференциальное связывание именно с этими сайтами и происходит ли оно в экстракте корней.

III.C. РЕЦЕПЦИЯ NOD-ФАКТОРОВ В КОРТЕКСЕ И ПЕРИЦИКЛЕ

Экзогенно добавляемые Nod-факторы индуцируют ответы в эпидермисе – ткани, которая непосредственно с ними реагирует, однако ответы наблюдают также в кортексе и в перицикле. Первый вопрос, который возникает в этой связи – переносится ли Nod-фактор из эпидермиса в более глубоко расположенные ткани и опознается ли он в них, или же данные ответы индуцируются вторичными посредниками, которые образуются в эпидермисе.

Бобовые умеренных широт формируют недетерминированные клубеньки из примордиев, которые закладываются во внутреннем кортексе под действием Nod-факторов, декорированных высоконенасыщенной ацильной группой. Однако у тропических бобовых с клубеньками детерминированного типа деления индуцируются в наружном кортексе, и эту реакцию вызывает Nod-фактор с гораздо более насыщенной (C18:1) группой. Это позволяет предположить, что высоконенасыщенная ацильная группа необходима для транспорта Nod-фактора во внутренние слои кортекса, что согласуется с данными об индукции клеточных делений при действии хитинового фрагмента, “выстреленного” внутрь кортекса (Spaink et al., 1994).

Механизмы рецепции Nod-факторов могут быть адекватно изучены с помощью меченых молекул. Их использование позволит выяснить, транспортируется ли Nod-фактор из эпидермиса во внутренние ткани корня или он претерпевает процессинг в эпидермисе для индукции клеточных делений в кортексе, а также для активации гена *ENOD12* в перицикле.

IV. Ответы растений, сходные с защитными реакциями

На различных стадиях взаимодействия бактерии и растения-хозяева находятся в тесных отношениях, кульминацией которых является образование клубеньков, где бактерии колонизируют цитоплазму растительных клеток. Хотя такие клетки содержат большое количество бактерий, активные защитные реакции у растения не развиваются. Их отсутствие определяется поверхностными детерминантами бактерий, а также и мембранными структурами хозяина, которые предохраня-

ют бактерии от прямого контакта с цитоплазмой. Бактериальные детерминанты, которые вовлечены в подавление реакций защиты, включают липополисахариды и экзополисахариды: мутанты, дефектные по их синтезу, не формируют клубеньки (или их образование резко подавлено). Кроме того, эти мутанты индуцируют у растений ответы, сходные с реакцией сверхчувствительности (Niehaus et al., 1993; Parniske et al., 1994; Perotto et al., 1994).

Хотя ризобии хорошо адаптированы к действию защитных систем растения, они частично индуцируются, даже в случае образования нормальных азотфиксирующих клубеньков. Только небольшая доля бактерий способна вызывать образование сайтов инфекции, из которых развиваются клубеньки, так как большинство инфекционных нитей abortируется в эпидермисе или кортексе. В случае симбиоза *R. meliloti*-люцерны было выявлено наличие сайтов инфекции, в которых наблюдают полный некроз бактериальных и растительных клеток (Vasse et al., 1993). В таких некротических сайтах была выявлена активная кислая растительная хитиназа, которая связана с развитием защитных реакций. Напротив, фенилаланин аммонийлиаза (ФАЛ) и халконсинтаза (ХС) — ферменты, которые играют важную роль в биосинтезе флавоноидов, обнаружены как в некротических, так и в живых растительных клетках. Было высказано предположение о том, что хозяин ограничивает развитие значительной части инфекционных нитей за счет ответов, сходных с реакцией гиперчувствительности. Поскольку такие ответы индуцируются только теми ризобиями, которые производят Nod-факторы, очевидно, что они играют двоякую роль: с одной стороны, запускают программу развития клубеньков, а с другой — могут быть элиситорами реакции гиперчувствительности, что позволяет растению контролировать количество сайтов инфекции. Весьма существенным является вопрос о том, почему реакции гиперчувствительности запускаются только в некоторых сайтах инфекции.

Экспрессия ФАЛ и ХС в кортексе может определяться синтезом специфических флавоноидов и не обязательно связана с фитоалексинами. Это было доказано результатами изучения взаимодействий люцерны и микоризных грибов (Harrison et al., 1994). При колонизации грибами отмечали повышенный уровень транскриптов ФАЛ и ХС в клетках кортекса, содержащих арбускулы. В то же время, транскрипты изофлавоноредуктазы, принимающей участие в биосинтезе фитоалексина медикарпина, обнаруживаются в повышенном количестве в неколонизированных кортикальных клетках.

Показано, что мРНК ХС накапливается в клетках клубеньковых примордиев (Yang et al., 1992), однако неясно, имеет ли она отношение к защитным реакциям или к синтезу флавоноидов, которые действуют в качестве специфических индукторов ризобияльных генов клубенькообразования, а также влияют на полярный транспорт ауксинов (Hirsch et al., 1989). Тот факт, что Nod-факторы состоят из хитинового скелета и остатка жирной кислоты, делает возможным их функционирование в качестве элиситоров защитных реакций растения (Baureithel et al., 1994; Staehelin et al., 1994). У клевера *Trifolium subterraneum* Nod-факторы, возможно, играют роль в индукции гена ХС, поскольку ее вызывают только те бактерии, которые производят Nod-факторы (Lawson et al., 1994).

V. Литература

- Allen N.S., Bennett M.N., Cox D.N., Stupley A., Ehrhardt D.W., Long S.R. (1994) In: Daniels M.G., Downie J.A., Osbourne A.E. (eds) *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. V. 3. Dordrecht, Kluwer Acad. Publ., p. 107-114.
- Ardourel M., Demont N., Debelle F., Maillet F., de Billy F., Prome J.-C., Denarie J., Truchet G. (1994) *Plant Cell*. V. 6, p. 1357-1374.
- Asad S., Fang Y., Wycoff K.L., Hirsch A.M. (1994) *Protoplasma*. V. 183, p. 10-23.
- Baureithel K., Felix G., Boller T. (1994) *J. Biol. Chem.* V. 269, p. 17931-17938.
- Bono J.-J., Riond J., Nicolaou K.C., Bockovich N.J., Estevez V.A., Cullimore J.V., Ranjeva R. (1995) *Plant J.* V. 7, p. 253-260.
- Clark C.A., Beltrame J., Manning P.A. (1991) *Gene*. V. 106, p. 43-52.
- Cook D., Dreyer D., Bonnet D., Howell M., Nony E., VandenBosch K. (1995) *The Plant Cell*. V. 7, p. 43-55.
- Cooper J.B., Long S.R. (1994) *The Plant Cell*. V. 6, p. 215-225.
- Crespi M.D., Jurkevitch E., Poiret M., d'Aubenton-Carafa Y., Petrovics G., Kondorosi E., Kondorosi A. (1994) *EMBO J.* V. 13, p. 5099-5112.
- Davis E.O., Evans I.J., Johnston A.W.B. (1988) *Mol. Gen. Genet.* V. 212, p. 531-535.

- De Jong A.J., Heidstra R., Spaink H.P., Hartog M.H., Meijer E.A., Hendriks T., Lo Schiavo F., Terzi M., Bisseling T., Van Kammen A., de Vries S.C. (1993) *The Plant Cell*. V. 5, p. 615-620.
- De Ruijter N. (1997) *Plant J.* (in press).
- Ehrhardt D.W., Atkinson E.M., Long S.R. (1992) *Science*. V. 256, p. 998-1000.
- Ehrhardt D.W., Wais R., Long S.R. (1996) *Cell*. V. 85, p. 673-681.
- Felle H.H., Kondorosi E., Kondorosi A., Schultze M. (1995) *Plant J.* V. 7, p. 939-947.
- Felle H.H., Kondorosi E., Kondorosi A., Schultze M. (1996) *Plant J.* V. 10, p. 295-301.
- Fimun J.L., Wilson K.E., Carlson R.W., Davies A.E., Downie J.A. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 10, p. 351-360.
- Geurts R., Heidstra R., Hadri A.-E., Downie J.A., Franssen H., Van Kammen A., Bisseling T. (1997) *Plant Physiol.* V. 115, p. 351-359.
- Harrison M.J., Dixon R.A. (1994) *Plant J.* V. 6, p. 9-20.
- Heidstra R., Geurts R., Franssen H., Spaink H.P., Van Kammen A., Bisseling T. (1994) *Plant Physiol.* V. 105, p. 787-797.
- Heidstra R., Yang W.-C., Yalcin Y., Peck S., Emons A., Van Kammen A., Bisseling T. (1997) *Development*. V. 124, p. 1781-1787.
- Hirsh A.M., Bhuvaneswari T.V., Torrey J.G., Bisseling T. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 86, p. 1244-1248.
- Horvath B., Heidstra R., Lados M., Moerman M., Spaink H.P., Prome J.-C., Van Kammen A., Bisseling T. (1993) *Plant J.* V. 4, p. 727-733.
- Journet E.P., Pichon M., Dedieu A., de Billy F., Truchet G., Barker D.G. (1994) *Plant J.* V. 6, p. 241-249.
- Kijne J.W. (1992) In: Stacey G., Burris R.H., Evans H.J. (eds). *Biological Nitrogen Fixation*. NY, Chapman and Hall, p. 349-398.
- Kouctü H., Hata S. (1993) *Mol. Gen. Genet.* V. 238, p. 106-119.
- Kozik A., Heidstra R., Horvath B., Kulikova O., Tikhonovich I., Noel Ellis T.H., Van Kammen A., Lie T.A., Bisseling T. (1995) *Plant Sci.* V. 108, p. 41-49.
- Kurkdjian A.C. (1995) *Plant Physiol.* V. 107, p. 783-790.
- Lawson C.G.R., Djordjevic M.A., Weinman J.J., Rolfe B.G. (1994) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 498-507.
- Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Prome J.-C., Denarie J. (1990) *Nature*. V. 344, p. 781-784.
- Libbenga K.R., Van Iren F., Bogers R.J., Schraag-Lammers M.F. (1973) *Planta*. V. 114, p. 29-39.
- Lie T.A. (1984) *Plant and Soil*. V. 82, p. 415-425.
- Lopez-Lara I.M., Van den Berg J.D.J., Thomas-Gates J.E., Glushka J., Lugtenberg B.J.J., Spaink H.P. (1995) *Mol. Microbiol.* V. 15, p. 627-638.
- Matvienko M., Van de Sande K., Yang W.C., Van Kammen A., Bisseling T., Franssen H. (1994) *Plant Mol. Biol.* V. 26, p. 487-493.
- Mergaert P., Van Montagu M., Prome J.-C., Holsters M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 90, p. 1551-1555.
- Miller D.D., Callahan D.A., Gross D.J., Hepler P.K. (1992) *J. Cell Sci.* V. 101, p. 7-12.
- Minami E., Kouchi H., Cohn J.R., Ogawa T., Stacey J. (1996) *Plant J.* V. 10, p. 23-32.
- Niebel A., Bono J.J., Ranjewa R., Cullimore J.V. (1997) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 10, p. 132-134.
- Niehaus K., Kapp D., Puhler A. (1993) *Planta*. V. 190, p. 415-425.
- Parniske M., Schmidt P.E., Kosch K., Muller P. (1994) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 631-638.
- Perotto S., Brewin N.J., Kannerberg E.L. (1994) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 99-112.
- Pichon M., Journet E.P., Dedieu A., de Billy F., Truchet G., Barker D.G. (1992) *The Plant Cell*. V. 4, p. 1199-1211.
- Price N.P.J., Relic B., Talmont F., Lewin A., Prome D., Pueppke S.G., Maillet F., Denarie J., Prome J.C., Broughton W.J. (1992) *Mol. Microbiol.* V. 6, p. 3575-3584.
- Relic B., Talmont F., Kopicinska J., Golinowski W., Prome J.C., Broughton W.J. (1993) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 6, p. 764-774.
- Roche P., Debelle F., Maillet F., Lerouge P., Truchet G., Denarie J., Prome J.C. (1991a) *Cell*. V. 67, p. 1131-1143.
- Roche P., Lerouge P., Ponthus C., Prome J.C. (1991b) *J. Biol. Chem.* V. 266, p. 10933-10940.
- Rohrig H., Schmidt J., Wieneke U., Kondorosi E., Barlier I., Schell J., John M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 91, p. 3122-3126.
- Sanjuan J., Carlson R.W., Spaink H.P., Bhat R., Mark Barbour W., Glushka J., Stacey J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 89, p. 8789-8793.
- Scheres B., Van de Wiel C., Zalensky A., Horvath B., Spaink H.P., Van Eck H., Zwartkruis P., Wolters A.M., Gloudemans T., Van Kammen A., Bisseling T. (1990a) *Cell*. V. 60, p. 281-294.
- Scheres B., Van Engelen F., Van der Knaap E., Van de Wiel C., Van Kammen A., Bisseling T. (1990b) *The Plant Cell*. V. 8, p. 687-700.
- Schmidt J., Rohrig H., John M., Wieneke U., Koncz C., Schell J. (1993) *Plant J.* V. 4, p. 651-658.
- Schultze M., Quiclet-Sire B., Kondorosi E., Virelizier H., Glushka J.N., Endre G., Gero S.D., Kondorosi A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 89, p. 192-196.
- Sievers A., Schnepf E. (1981) In: *Cytomorphogenesis in Plants*, ed. Kiermayer O. *Cell Biology Monographs*. V. 8. Springer Verlag, Wien, NY.
- Smit G., Van Brussel A.A.N., Kijne J.W. (1993) In: Palacios R., Mora J., Newton W.E. (eds). *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., p. 371.
- Spaink H.P., Sheely D.M., Van Brussel A.A.N., Glushka J., York W.S., Tak T., Geiger O., Kennedy E.P., Reinhold V.N., Lugtenberg B.J.J. (1991) *Nature*. V. 354, p. 125-130.

- Spaink H.P., Bloembergen G.V., Wijffes A.H.M., Ritsema T., Geiger O., Lopez-Lara I.M., Harteveld M., Kafetzopoulos D., Van Brussel A.A.N., Kijne J.W., Lugtenberg B.J.J., Van de Drift K.M.G.M., Thomas-Gates J.E., Potrykus I., Sautter C. (1994a) In: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. V. 3, p. 91-98. Daniels M.J., Downie J.A., Osbourne A.E. (eds.). Kluwer Acad. Publ.: Dordrecht.
- Stachelin C., Granado J., Muller J., Wiemken A., Mellor R.B., Felix G., Regenaas M., Broughton W.J., Boller T. (1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 91, p. 2196-2200.
- Stachelin C., Schultze M., Kondorosi E., Mellor R.B., Boller T., Kondorosi A. (1994b) *Plant J.* V. 5, p. 319-330.
- Stokkermans T.J.W., Peters N.K. (1994) *Planta*. V. 193, p. 413-420.
- Tanimoto M., Robert K., Dolan L. (1995) *Plant J.* V. 8, p. 943-948.
- Truchet G., Roche P., Lerouge P., Vasse J., Camut S., de Billy F., Prome J.C., Denarie J. (1991) *Nature*. V. 351, p. 670-673.
- Turgeon B.G., Bauer W.D. (1985) *Planta*. V. 163, p. 328-349.
- Van Batenburg F.H.D., Jonker R., Kijne J.W. (1986) *Physiol. Plant.* V. 66, p. 476-480.
- Van Brussel A.A.N., Bakhuizen R., Van Spronsen P.C., Spaink H.P., Tak T., Lugtenberg B.J.J., Kijne J.W. (1992) *Science*. V. 257, p. 70-71.
- Van de Sande K., Pawlowski K., Csaja I., Wieneke U., Schell J., Schmidt J., Walden R., Matvienko M., Wellink J., Van Kammen A., Franssen H., Bisseling T. (1996) *Science*. V. 273, p. 370-373.
- Van Spronsen P.C., Bakhuizen R., Van Brussel A.A.N., Kijne J.W. (1994) *Eur. J. Cell. Biol.* V. 64, p. 88-94.
- Van Spronsen P.C., Van Brussel A.A., Kijne J.W. (1995) *Eur. J. Cell. Biol.* V. 68, p. 463-469.
- Vasse J., de Billy F., Truchet G. (1993) *Plant J.* V. 4, p. 555-566.
- Verma D.P.S. (1992) *The Plant Cell*. V. 4, p. 373-382.
- Vijn I., das Neves L., Van Kammen A., Franssen H., Bisseling T. (1993) *Science*. V. 260, p. 1764-1765.
- Vijn I., Martinez-Abarca F., Yang W.C., das Neves L., Van Brussel A., Van Kammen A., Bisseling T. (1995a) *Plant J.* V. 8, p. 111-119.
- Vijn I., Yang W.C., Pallisgard N., Ostergaard Jensen E., Van Kammen A., Bisseling T. (1995b) *Plant Mol. Biol.* V. 28, p. 1111-1119.
- Wilson C.W., Long F., Maruoka E.M., Cooper J.B. (1994) *The Plant Cell*. V. 6, p. 1265-1275.
- Wipf L., Cooper D.C. (1938) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 24, p. 87-91.
- Yang W.C., Canter Cremers H.C.J., Hogendijk P., Katinakis P., Wijfelman C.A., Franssen H., Van Kammen A., Bisseling T. (1992) *Plant J.* V. 2, p. 143-151.
- Yang W.C., de Blank C., Meskiene I., Hirt H., Bakker J., Van Kammen A., Franssen H., Bisseling T. (1994) *The Plant Cell*. V. 6, p. 1415-1426.
- Yang W.C., Katinakis P., Hendriks P., Smolders A., de Vries F., Spec J., Van Kammen A., Bisseling T., Franssen H. (1993) *Plant J.* V. 3, p. 573-585.
- Zaat S.A.J., Van Brussel A.A.N., Tak T., Lugtenburg B.J.J., Kijne J.W. (1989) *Planta*. V. 177, p. 141-150.

Колонизация клеток и тканей *Rhizobium*: структура и развитие инфекционных нитей и симбиосом

Бревин Н.

I.	Колонизация межклеточного пространства: образование инфекционных нитей.....	451
I.A.	Развитие.....	451
I.B.	Растительные компоненты.....	453
I.C.	Бактериальные компоненты.....	455
II.	Эндоцитоз бактерий и дифференцировка бактериоидов.....	456
II.A.	Эндоцитоз.....	456
II.B.	Адаптация бактерий.....	457
III.	Симбиосомы и функции симбиосомной мембраны.....	458
III.A.	Развитие	458
III.B.	Состав.....	460
III.C.	Обмен метаболитами.....	460
III.D.	Автолиз.....	461
IV.	Выводы.....	462
V.	Благодарности.....	462
VI.	Литература.....	462

I. Колонизация межклеточного пространства: образование инфекционных нитей

I.A. РАЗВИТИЕ

В этой книге уже неоднократно обсуждались функции липо-хитиновых Nod-факторов, синтезируемых ризобиями. Эти факторы важны для индукции многих ранних процессов в морфогенезе клубеньков (Long, 1996), однако для колонизации тканей и клеток необходимы дополнительные системы взаимодействия симбионта и хозяина (van Spronsen et al., 1994; Vijn et al., 1995). Эта колонизация наиболее подробно изучена для люцерны (Benaben et al., 1995), клевера (de Boer, Djordjevic, 1995) и гороха (Kijne, 1992; Rae et al., 1992).

Перед внедрением бактерий корневые волоски, скрученные под действием Nod-факторов, принимают форму “колец Шеппарда” (Dart, 1975). Эта окончательная форма деформации не может быть вызвана Nod-факторами и проявляется только в присутствии живых клеток ризобий на поверхности корневых волосков. В карманах, образованных скрученным волоском, происходит внедрение бактерий, очевидно связанное с ослаблением стенки волоска и последующей инвагинацией растительной плазмалеммы (van Spronsen et al., 1994; Kijne, 1992). Внедрение бактерий облегчается развитием инфекционной нити, связанным с локальным нарастанием материала растительной клеточной стенки. Инфекционная нить – это тубулярная структура, стенки которой являются продолжением клеточной стенки и сходны с ней по составу (рис. 1). Внутреннее пространство инфекционной нити, в котором располагаются бактерии, является топологически межклеточным (Van den Bosch et al., 1989; Rae et al., 1992) (рис. 2). Механизмы образования инфекционной нити и клеточной стенки сходны, причем ризобии модифицируют процесс развития структур растительной клетки. Стенка инфекционной нити предотвращает прямой контакт бактерий и растительных клеточных мембран.

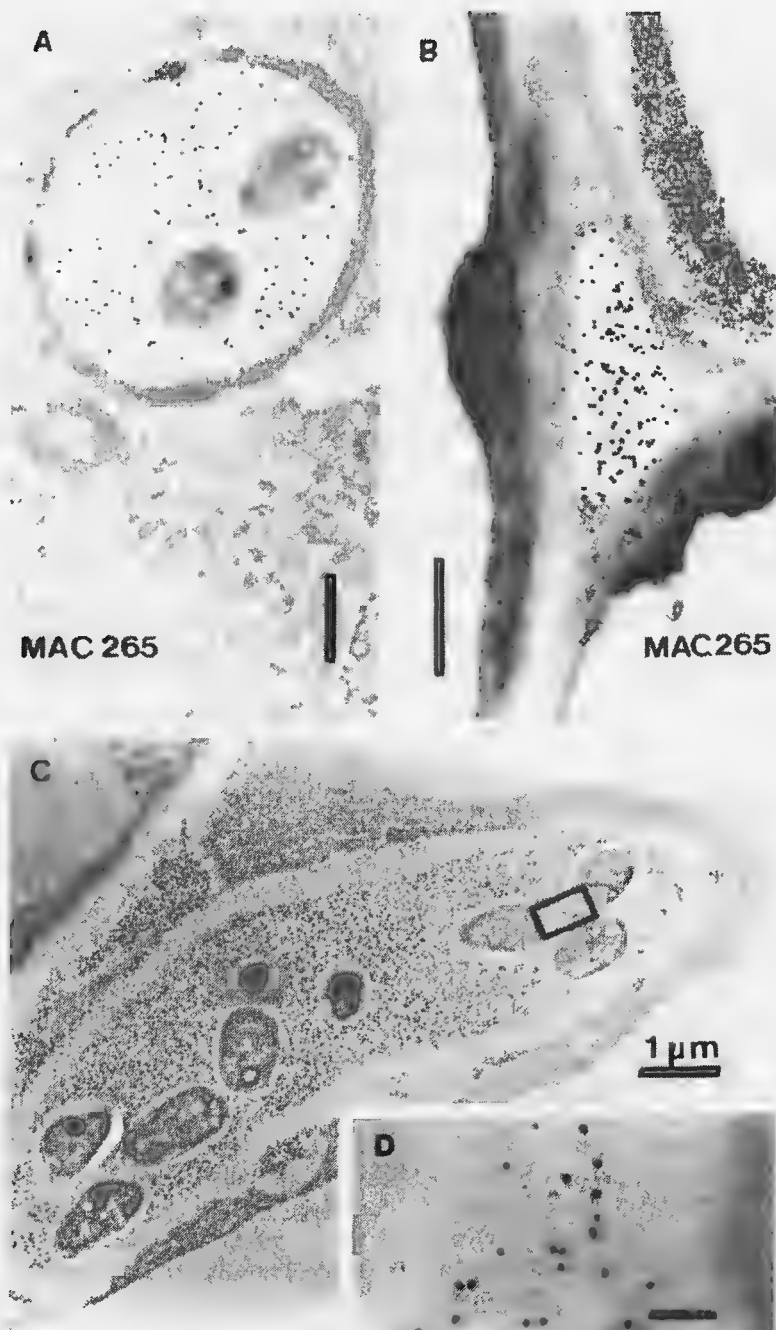


Рисунок 1. Электронно-микроскопический анализ инфекционных нитей и межклеточных пространств с использованием антител, конъюгированных с золотом, для маркировки материала матрикса.

А — поперечный срез инфекционной нити в клубеньке гороха с маркированным материалом матрикса. Видны две бактериальные клетки, окруженные капсулами.

В — срез стыка трех клеток в инфицированной паренхиме клубенька с маркированным межклеточным матриксом.

С — продольный срез внутриклеточной инфекционной нити, примыкающей к клеточной стенке.

Д — увеличенный фрагмент фотографии С, показывающий двойную маркировку антигенов гликопротеина и липоксигеназы (размеры коллоидных частиц 20 и 5 нм, соответственно).

Масштаб линейки: 1 мкм (А, В, С) и 200 нм (D). А и В из статьи VandenBosch et al., 1989; С и D — любезно предоставлены D.J.Sherrier.

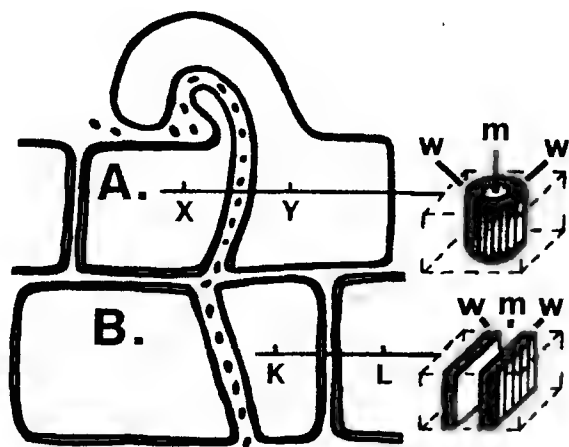


Рисунок 2. Топология инфекционной нити по отношению к межклеточному пространству.

А — скручивание корневого волоска и инициация инфекционной нити.

В — распространение инфекционной нити как трансклеточного туннеля в коре корня и субапикальной инфекционной зоне клубенька. Срезы X-Y и K-L позволяют сравнить топологию трансклеточной инфекционной нити (цилиндр) и межклеточного пространства (плоскость): w — стенка, m — внеклеточный матрикс во внутреннем пространстве инфекционной нити или в межклеточном пространстве (Rae et al., 1992).

Рост инфекционной нити является апикальным (Dart, 1975) и очевидно связан с реструктуризацией цитоскелета растительной клетки. Он приводит к смещению ядра из нормальной позиции вблизи кончика корневого волоска (Lloyd et al., 1987) и к его реассоциации с растущим кончиком инфекционной нити (рис. 1, а). Ось роста инфекционной нити пересекает клетку-хозяина и очевидно предопределена внутриклеточным тягом цитоплазмы (Van Brussel et al., 1992), ориентация которого определяется как “преинфекционная структура”, возникающая при реактивации клеточного цикла Nod-факторами ризобий (Yang et al., 1994). В процессе внутриклеточного роста инфекционная нить сливается с материнской клеткой по неизвестному механизму, освобождая содержимое в межклеточное пространство на проксимальной стороне эпидермальной клетки (Brewin, 1991; Rae et al., 1992). В этом месте происходит стимуляция близлежащей кортикальной клетки к формированию в ней инфекционной нити, и этот процесс повторяется в направлении пост-меристематических клеток, возникших из клубенькового примордия. Таким образом, в зрелых недетерминированных клубеньках имеется суб-меристематический район, зона инвазии, в которой ветвящиеся инфекционные нити пересекают недавно разделившиеся кортикальные клетки, и таким образом формируется центральная ткань клубенька, в которой происходит азотфиксация (рис. 3).

У других бобовых, например у *Phaseolus vulgaris*, внутриклеточные инфекционные нити не столь важны потому, что ризобии распространяются через межклеточный матрикс или потому, что бактерии освобождаются из инфекционных нитей в цитоплазму гиподермальных кортикальных клеток, которые делятся в результате реактивации клеточного цикла. В этом случае исходная внутриклеточная инфекционная нить в зрелой инфицированной хозяйской клетке становится рудиментарной. Таким образом, под инфекционными нитями у бобовых понимают три различные структуры. Существуют межклеточные нити, которые проникают через разрывы эпидермиса и/или путем растворения срединных пластинок, например у *Andira* и *Mimosa*; трансклеточные инфекционные нити, обеспечивающие распространение ризобий через немитотические ткани, например у *Pisum*; и наконец внутриклеточные интрузии или “инфекционные карманы” (Rae et al., 1992), которые проникают через индивидуальные клетки и освобождают ризобии в цитоплазму в составе эндоцитируемых симбиосом, например у *Phaseolus*. Более того, трансклеточные инфекционные нити, выявляемые у бобовых с детерминированными клубеньками, значительно тоньше, чем у бобовых с недетерминированными клубеньками. В последнем случае, например у гороха, более половины внутреннего пространства заполнено матриксом (рис. 1), тогда как у первого типа, например у фасоли, матрикса мало и ризобии упакованы одним плотным слоем в пространстве между стенками нити (Rae et al., 1992; Kijne, 1992).

1.В. РАСТИТЕЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ

Несмотря на малую доступность инфекционных нитей для биохимического изучения, достигнут некоторый прогресс в понимании их структуры и регуляции развития. С использованием

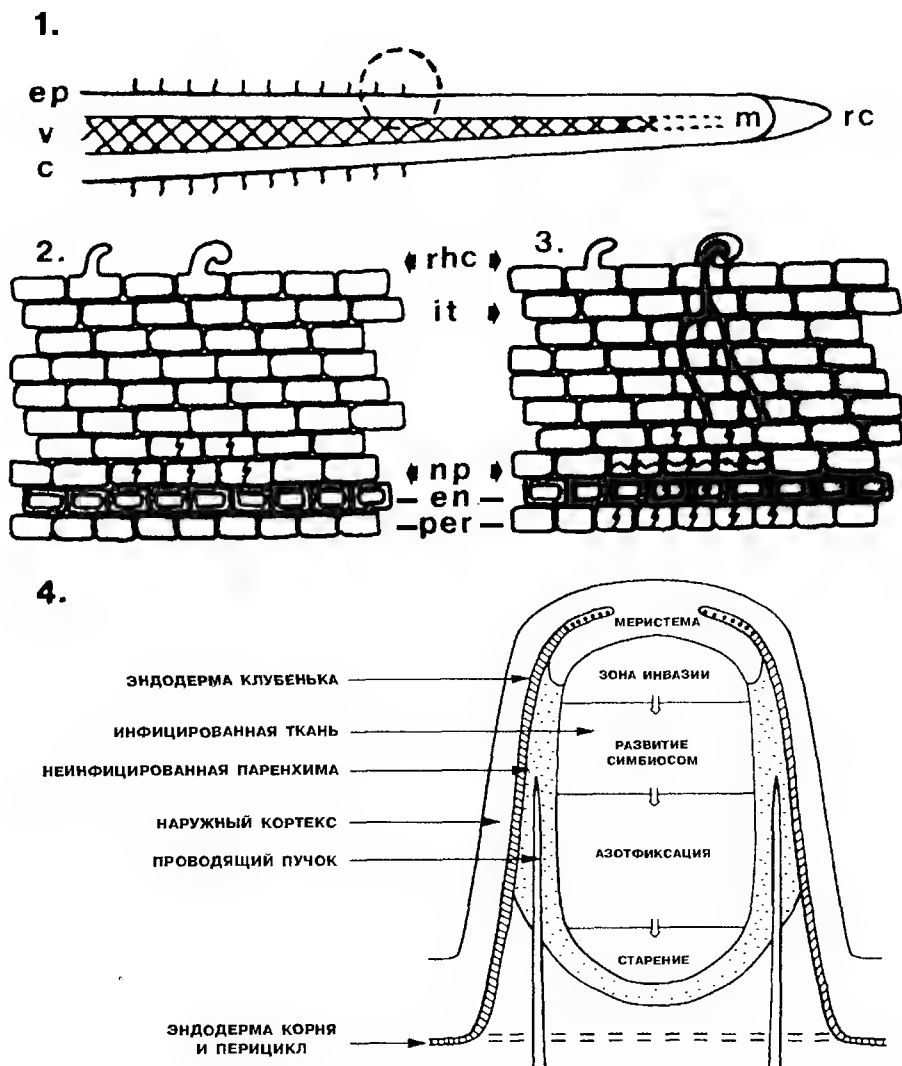


Рисунок 3. Стадии инвазии тканей и клеток ризобиями.

1 — кончик корня с обозначением зоны инфекции (в кружке) в области появления корневых волосков, проксимально от апикальной меристемы (m) и корневого чехлика (rc).

2 — срез коры корня, показывающий два ранних ответа на диффундирующие сигналы ризобий: скручивание корневых волосков (rhc) и индукция деления кортикальных клеток, формирующих примордий клубенька (np) вблизи эндодермы (en) и перицикла (per).

3 — последующее развитие инфекционной нити (it) как трансклеточного туннеля, содержащего ризобии, а также развитие клубенькового примордия, захватывающее клетки эндодермы и перицикла с образованием меристематической зоны, еще свободной от ризобий.

4 — поздняя стадия. Меристема вышла за пределы корня и заняла апикальную позицию, оставаясь не инфицированной бактериями и дав начало тканям, составляющим клубенек. Центральная часть клубенька инфицирована ризобиями и в ней происходит азотфиксация при микроаэрофильных условиях. Наружные неинфицированные ткани развиваются в проводящие пучки, эндодерму и наружную кору, состоящую из паренхиматозных клеток, которые могут функционировать как газовый барьер, регулирующий поступление кислорода в центральную часть клубенька (Brewin, 1991).

специфических антител, конъюгированных с золотом, при анализе срезов клубеньков гороха показано, что стенки инфекционных нитей и растительных клеток содержат целлюлозу, ксиланоглюкан, метил-этерифицированный пектин и неэтерифицированный пектин. Однако при этом выяснилось, что стенка инфекционной нити более устойчива к обработке деградирующими ферментами (Higashi et al., 1987), что говорит о дополнительной химической модификации. Изучение экспрессии генов, усиленной в клубеньках, показало, что глицин-богатые белки могут быть новыми компонентами, возникающими при инвазии (Kuster et al., 1995).

Состав материала матрикса возможно играет большую роль в регуляции развития инфекционной нити. Van den Bosch и соавторы (1989) с использованием моноклонального антитела MAC265 показали, что главным компонентом матрикса инфекционных нитей в клубеньках гороха является растительный гликопротеин с молекулярной массой 95-110 кДа (рис. 1). Этот антиген выявляется также в межклеточных пространствах неинфицированной клубеньковой паренхимы и неинфицированных тканей вблизи апикальной меристемы. В другой работе показано наличие пролин-богатых белков (ПББ) как главного компонента матрикса инфекционных нитей гороха (Sherrier, van den Bosch, 1994). Эти авторы также отметили сходство локализации ПББ, выявляемое с помощью антител, и определенного раннего нодулина (ENOD12), который кодирует белок размером 12.5 кДа, содержащий два пролин-богатых пентапептидных повтора (Scheres et al., 1990a). Хотя ENOD12 оказался очень удобным для изучения транскрипционной регуляции, индуцируемой Nod-фактором, не удалось доказать его участия в клубенькообразовании у *Medicago* spp. (Csanadi et al., 1994).

Изучение взаимодействий некоторых растений с патогенами показало, что гликопротеины, узнаваемые MAC265, и антитела против ПББ участвуют в перекрестных реакциях (Bradley et al., 1992). Перекрестно-реагирующие белки, очевидно участвующие в освобождении перекиси водорода во внеклеточный матрикс, могут быть узнаны по быстрому физическому ответу, который затрудняет проникновение патогенов в ткань хозяина. Таким образом, локализация сходных гликопротеинов в матриксе инфекционных нитей говорит о возможности того, что эти компоненты синтезируются в результате защитной реакции и их функцией является предотвращение или контроль инвазии тканей ризобиями. Другим косвенным доказательством возможной роли активных форм кислорода в регуляции развития инфекционной нити является идентификация клеточных пероксидаз (Salzwedel, Dazzo, 1993; Cook et al., 1995) и локализация липокигеназного антигена в матриксе инфекционной нити (Gardner et al., 1996) (рис. 1, D). Кроме того, диамин-оксидаза которая может генерировать перекись водорода и вызывать перекрестное связывание белков в межклеточном матриксе (Tipping, McPherson, 1995; Chiarello et al., 1996), идентифицирована в клубеньках гороха и очевидно присутствует в матриксе инфекционных нитей (C.D.Gardner, J.P.Wisniewski, личное сообщение).

Характеристика других растительных компонентов в матриксе инфекционной нити носит предварительный характер. Путем гибридизации *in situ* в инфекционных нитях гороха выявлен арабингалактановый белок, кодируемый PsENOD5 (Scheres et al., 1990b) и цистеиновая протеаза, кодируемая PsCYP15a (Kardailsky, Brewin, 1996). Активность протеазы в межклеточном матриксе может объяснить то, что мутанты *Rhizobium*, аукоотрофные по аминокислотам, сохраняют способность к нормальной нодуляции (Beringer et al., 1980). Усиление экспрессии генов, кодирующих цистеиновую протеазу и субтилизин-подобную протеазу, показано также при развитии *Frankia* в клубеньках *Alnus* (Goettling-Minesky, Mullin, 1994; Ribeiro et al., 1995).

1.С. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ

Идентификация компонентов потенциальной системы ограничения роста и деления бактерий в инфекционной нити указывает на то, что мы еще мало знаем об особенностях ризобий, позволяющих им проникать в растительные клетки, не вызывая сильных защитных реакций. Локализованные защитные реакции часто наблюдают при взаимодействии ризобий с некомплементарными видами бобовых (Kannenberg, Brewin, 1994; de Boer, Djordjevic, 1995). Даже при колонизации корневых волосков люцерны совместимым штаммом развитие инфекционных нитей блокиру-

ется за счет локализованных защитных реакций (Vasse et al., 1993), что говорит о наличии тонкого баланса между симбиотическими и патогенными взаимодействиями в клубеньках.

Клетки ризобий внутри инфекционных нитей обычно имеют коккоидную форму и заключены в капсулы (рис. 1, А). Она состоит из внеклеточного полисахарида (ЭПС) (Leigh, Walker, 1994) и тесно связана с капсульным полисахаридом, известным как К-антиген (Reuhs et al., 1995; Rolfe et al., 1996). Липополисахариды и двухвалентные ионы кальция повышают стабильность этого внеклеточного образования, которое может способствовать защите бактерий от иммунных реакций хозяина (Kannenberg, Brewin, 1994). У гороха при инокуляции мутантами, дефектными по липополисахаридам (ЛПС) (рис. 3), формирование инфекционной нити сильно нарушено, бактерии лишь спорадически высвобождаются в клетки хозяина и наблюдаются многочисленные проявления локальных защитных реакций (Perotto et al., 1994). Еще более сильное влияние оказывают мутации, нарушающие ЛПС, на развитие клубеньков у фасоли и сои (Noel et al., 1986; Stacey et al., 1991): оно выражается в абортации инфекционных нитей уже в корневых волосках или в наружном кортексе. В дополнение к структурной роли, появляется все больше доказательств участия полисахаридов в сигнальных взаимодействиях при инфицировании тканей и подавлении защитных реакций хозяина (Ozga et al., 1994; Becker et al., 1995).

II. Эндоцитоз бактерий и дифференцировка бактериоидов

II.A. ЭНДОЦИТОЗ

Инвазия клеток и тканей сопровождается дифференциацией клеток хозяина, возникших из апикальной меристемы (рис. 3). В ходе развития клубенька азотфиксирующая активность проявляется у ризобий после их эндоцитоза. У гороха и других травянистых бобовых с недетерминированными клубеньками он происходит из бесстеночных инфекционных капель, возникающих из инфекционных нитей (рис. 4). Эти капли окружены одиночной мембраной, которая является продолжением растительной плазмалеммы (Dart, 1975). Они содержат матрикс, который по составу сходен с матриксом инфекционной нити, что выражается, например, в присутствии антиге-

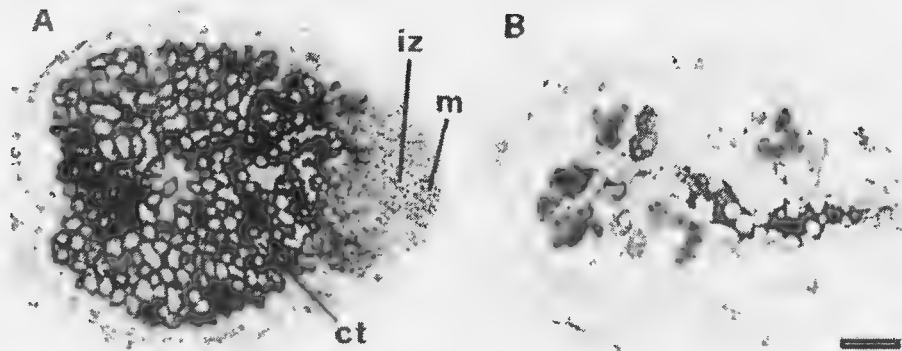


Рисунок 4. Клубеньки гороха, инфицированные *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*.

А — продольный срез клубенька, содержащий ризобии дикого типа: m — неинфицированная апикальная меристема, iz — зона инвазии, содержащая инфекционные нити, ct — центральная зона, в которой каждая растительная клетка содержит по несколько тысяч бактерий.

В — клубеньк гороха, образованный мутантом ризобий, дефектным по синтезу липополисахаридов. Инвазия бактериями растительных тканей и клеток снижена, бактериоиды имеют аномальную структуру, усилены защитные реакции растения, линейка — 0.5 мм (Perotto et al., 1994).

на MAC265 (Rae et al., 1992). У гороха симбиосомная мембрана (называемая также перибактероидной мембраной) претерпевает деления синхронно с бактериоидами, которые оказываются инкапсулированными по одному, за исключением интересного симбиотически дефектного мутанта Sprint2 Fix⁻ (Borisov et al., 1992). Перешедшие в цитоплазму бактериальные клетки претерпевают деления и дифференцировку в эндосимбиотические азотфиксирующие клетки (бактериоды). Это связано с прогрессивным изменением клеточной морфологии, возникновением характерной Y-образной формы и включает изменения экспрессии бактериальных генов (глава 23).

Пока еще мало известно о механизмах перехода бактерий в цитоплазматические компартменты (Bassett et al., 1977). Важную роль в обеспечении тесного контакта бактерий и растительной клетки играет то, что симбиосомная мембрана, как и мембрана инфекционной капли, лишены клеточных стенок (Rae et al., 1992). С использованием изолированных фрагментов симбиосомных мембран гороха показано физическое взаимодействие симбиосомной и наружной бактериоидной мембран *in vitro* (Bradley et al., 1986). Это взаимодействие между растительной и бактериальной мембранами может обеспечивать эндоцитоз ризобияльных клеток. О-антиген бактериального ЛПС играет важную роль в этом процессе, так как мутанты, дефектные по его образованию, не могут проходить нормальный эндоцитоз (Perotto et al., 1994). Имеются также данные о роли бора на этой стадии развития клубенька, и была предложена молекулярная модель, предполагающая роль ионов бората в стабилизации взаимодействия бактериальной клеточной поверхности и мембраны растительной клетки в сайте эндоцитоза (Bolanos et al., 1996). Поверхностное взаимодействие этих двух мембран может объяснить то, что последовательные деления внутриклеточных бактериоидов сопровождаются синхронными делениями симбиосомной мембраны.

II.B. АДАПТАЦИЯ БАКТЕРИЙ

Очевидно, что при переходе бактерий из инфекционных нитей в симбиосому происходят существенные изменения в их микроокружении. Описан ряд бактериальных мутантов, выживаемость которых внутри растительных клеток резко снижена (Morrison, Verma, 1987; Glazebrook et al., 1993; Muller et al., 1995b). Например, мутации в бактериальном гене, кодирующем сигнальную пептидазу, приводят к нарушению стабильности бактериоидов в симбиосомах и к последующим изменениям экспрессии специфичных для симбиосомы нодулинов в инфицированных клетках сои (Muller et al., 1995a). С использованием слияния промоторов *exo*-генов с репортерными генами показано отсутствие экспрессии многих *exo*-генов в бактериоидах, хотя они активно экспрессируются у бактерий в инфекционных нитях. Хотя некоторые генетические системы их регуляции уже выявлены, остаются неясными физиологические механизмы контроля экспрессии *exo*-генов в различных зонах клубенька (Leigh, Walker, 1994). Изучение промоторов *nod*-генов, слитых с репортерами (например, с геном β -глюкуронидазы), и опыты по гибридизации *in situ* показали, что *nod*-гены также активно транскрибируются у бактерий в зоне инвазии клубеньков гороха и люцерны, однако их транскрипция в зрелых бактериоидах отсутствует (Sharma, Signer, 1990; Schlaman et al., 1991).

По мере дифференцировки бактериоиды должны адаптироваться к новым физиологическим условиям. Циклические β -глюканы, присутствующие в периплазматическом пространстве *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*, представляются важными для адаптации к эндофитным условиям (Dunlap et al., 1996). Эти полисахариды могут повышать осмотическую стабильность, о чем говорят результаты изучения осмотически стабильного мутанта *S. meliloti*, лишенного циклических β -(1,2)-глюканов (Quandt et al., 1992). Хотя этот мутант и был способен к инвазии растительных клеток через инфекционные нити, освобожденные бактерии не размножались в хозяйских клетках и развитие бактериоидов было заблокировано. Это говорит о важной роли клеточной стенки бактерий в их адаптации к условиям внутри симбиосомы. Иммунохимические исследования с помощью моноклональных антител показали, что ЛПС бактериоидов претерпевает регулярное изменение эпитопной структуры (Kannenberg et al., 1994). Очевидно, оно регулируется микроаэробными условиями и зависит от стадии развития инфицированных хозяйских клеток в клубеньках. Необычная морфология бактериоидов, формируемых ЛПС-дефектными мутантами (Perotto et al., 1994), также показы-

вает, что структура ЛПС важна для выживания бактериоидов. В норме деление внутриклеточных бактериоидов сопровождается немедленным делением симбиосомной мембраны, так что в одной мембране могут быть найдены не более двух бактерий (рис. 5). Однако в случае ЛПС-мутантов в симбиосомах выявляются по несколько бактериоидов, что говорит о роли ЛПС во взаимодействии с симбиосомной мембраной. Интересно, что ЛПС *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* содержит длинные (28-С) цепи жирных кислот (Bhat et al., 1991), которые, вероятно, придают дополнительную стабильность наружной бактериальной мембране и обеспечивают адаптацию к физиологическим стрессам в эндоситных условиях.

III. Симбиосомы и функции симбиосомной мембраны

III.A. РАЗВИТИЕ

Клетки зрелых клубеньков бобовых содержат по несколько тысяч бактериоидов, и у разных растений общая площадь перибактероидных мембран превышает площадь плазматической мембраны в 20-50 раз (Robertson et al., 1985; Verma, Hong, 1996). Клетки, содержащие дифференцированные бактериоиды, обычно увеличены, цитоплазма заполнена тесно упакованными бактериоидами, тонопласт полностью или частично редуцирован. Целостность симбиосомной мембраны является необходимым условием функционирования бактериоидов, а ее деградация - одно из первых последствий дисфункции бактериоидов (Werner et al., 1985). Несмотря на обильное развитие в хозяйской клетке, биогенез и дифференцировка симбиосомной мембраны изучена недостаточно (Verma, Hong, 1996). Первоначально бактерии переходят в растительную цитоплазму путем эндоцитоза, то есть отщипывания плазматических мембран от инфекционной нити и инфекционной капли (рис. 5). Последующий рост и деление внутриклеточных бактериоидов делает необходимым рост симбиосомной мембраны путем включения дополнительных везикул из аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулюма (Roth, Stacey, 1989a, 1989b). Находящиеся в мембране фосфатидинозитол-3-киназа и небольшие ГТФ-связывающие белки могут участвовать во включении мембранных везикул в симбиосомные компартменты (Cheon et al., 1993; Verma et al., 1994; Hong, Verma, 1994).

Представление о симбиосоме как о специализированном компартменте в системе внутренних мембран (Roth, Stacey, 1989b) было поставлено под сомнение после получения данных о том, что у многих деревянистых бобовых, например *Andira* (de Faria et al., 1987) и у небобового *Parasponia* (Trinick, 1979), ризобии не высвобождаются в цитоплазму в качестве окруженных мембраной клеток. Вместо этого ризобии развивают способность к азотфиксации внутри трубчатых структур, напоминающих тонкостенные инфекционные нити, специализированные структурно и функционально (Becking, 1992). После выяснения роли симбиосомных мембран у эволюционно продвинутых бобовых стало возможным оценить, насколько специализированной может считаться симбиосомная мембрана по сравнению с плазмалеммой или с мембраной инфекционной нити (в терминах приобретения или утраты определенных функций). Теперь мы, вероятно, сможем понять, в какой степени обмен метаболитами, который очевидно определяет активность бактериоидов в симбиосомах травянистых бобовых, мог возникнуть на основе еще неизвестных процессов, происходящих в "фиксационных" нитях более примитивных деревянистых бобовых.

По мере дифференцировки симбиосомная мембрана очевидно теряет некоторые функции плазматической мембраны: например, симбиосомная мембрана не накапливает материал клеточной стенки. В то же время, она осуществляет новые функции, которые более свойственны мембране тонопласта и эндоплазматического ретикулюма (Verma, Hong, 1996). Функциональная роль симбиосомной мембраны может рассматриваться с двух точек зрения, в зависимости от того, являются внутриклеточные бактерии потенциальными "друзьями" или "врагами" хозяина. Рассматривая ризобии как потенциальных друзей, бактериоиды и окружающие их мембраны можно считать аналогами прокариотической органеллы. С этой точки зрения, симбиосома - это недоразвитый эквивалент митохондрии или хлоропласта, специализированная цитоплазматическая органелла, связанная с усвоением молекулярного азота. В этом случае роль симбиосомной мембраны состоит в обмене метаболитами между бактериоидом и цитоплазмой хозяйской клетки, что способ-

ствует эффективной азотфиксации. Рассмотрение ризобий как потенциальных патогенов основано на способности некоторых из них к инфицированию тканей хозяина без включения азотфиксации. Например, бактерии могут быть лучше адаптированы к функционированию в альтернативном бобовом хозяине или могут просто быть мутантами по определенным стадиям процесса азотфиксации (Huang, 1986; Huang et al., 1993; Perotto et al., 1994). В этом случае ризобии становятся паразитами, и важная роль симбиосомной мембраны состоит в том, чтобы сохранить те свойства плазматической мембраны, которые позволяют выдерживать микробную атаку и ограничивать инвазию потенциально патогенного эндофита.

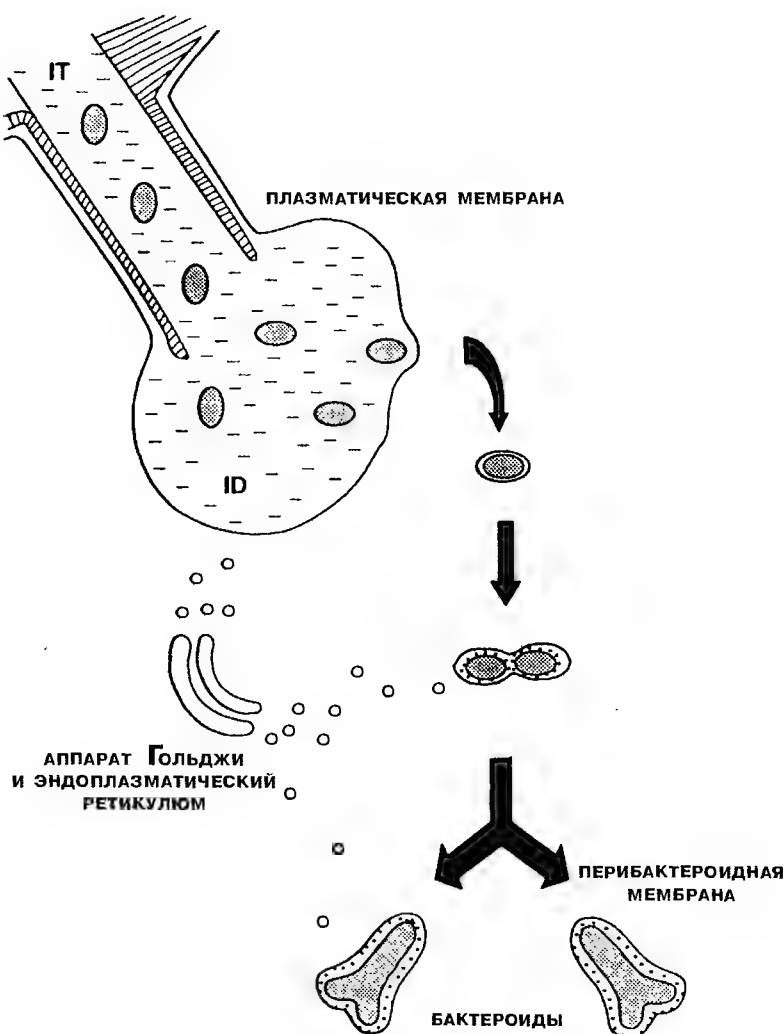


Рисунок 5. Биогенез симбиосомной мембраны.

Клетки ризобий переходят в растительную цитоплазму путем эндоцитоза, то есть выпячивания плазматической мембраны из инфекционной нити (ИТ), образующего инфекционную каплю (ID). Последующий рост и деление внутриклеточных бактериоидов предопределяет рост симбиосомной мембраны за счет телец аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулума (Roth, Stacey, 1989a, 1989b). Движение мембран и белков меняется во времени по мере специализации симбиосомной мембраны (Brewin et al., 1992).

III.B. СОСТАВ

Синтаза каллозы (1-3- β -глюкана), которая ранее считалась маркером плазматической мембраны, выявлена в очищенных препаратах симбиосомных мембран сои (Ahlborn, Werner, 1992). Этот фермент обычно считают важным компонентом растительной защитной системы, отвечающей на атаку патогена. Однако в клубеньках бобовых синтаза каллозы активируется только тогда, когда нарушен нормальный симбиотический баланс. Отложения каллозы могут быть выявлены на тонких срезах клубеньков клевера и сои, содержащих симбиотически дефектные или несовместимые штаммы ризобий (Ahlborn, Werner, 1992; Kumarasinghe, Nutman, 1977). В дополнение к синтазе каллозы, в симбиосомах выявлен ряд других индуцибельных защитных реакций, вызванных несоответствием партнеров. Он включает синтез антимикробных фитоалексинов (Werner et al., 1985; Niehaus et al., 1993), секрецию и окисление лигнинов и фенолов (Perotto et al., 1994) и накопление гидроксипролин-богатых гликопротеидов (Benhamou et al., 1991). Анализ библиотек клубенек-специфических кДНК из гороха и *Vicia faba* показал присутствие группы небольших цистеин-богатых белков, которые экспрессируются на разных стадиях развития симбиосомы (Kardailsky et al., 1993) и различных глицин-богатых белков (Kuster et al., 1995; Rice et al., 1993).

Для анализа компонентов перибактероидной мембраны интактные симбиосомы могут быть изолированы из гомогенатов клубеньков путем центрифугирования в градиенте плотности в условиях, защищающих от физического и осмотического повреждения (Robertson et al., 1978; Blumwald et al., 1985; Brewin et al., 1985; Garbers et al., 1988; Herrada et al., 1989; Price et al., 1987; Christiansen et al., 1995). При изучении клубеньков гороха были определены антигенные характеристики гликокаликса, связанные с внутренней стороной симбиосомной мембраны. Для этого использовали широкий спектр моноклональных антител и иммунологических проб (Perotto et al., 1991). Эти антигены гликокаликса выявлены также в плазматических мембранах инфицированных и неинфицированных клеток хозяина и иногда в мембране телец Гольджи, но не эндоплазматического ретикулюма. С использованием моноклонального антитела JIM18 недавно был идентифицирован и предварительно охарактеризован как гликофосфо-сфинголипид новый комплекс инозитол-содержащего гликолипида плазматических мембран. Иммулокализация на срезах клубеньков гороха показала, что этот антиген присутствует в плазматических мембранах и ювенильных (недифференцированных) симбиосомных мембранах, однако исчезает из симбиосомных мембран (но не из плазматической мембраны) дифференцированных клеток хозяина. Утрата этого антигена является наиболее ранним цитохимическим маркером дифференцировки симбиосомной мембраны, а возможно и сигналом, специфически регулирующим путь биогенеза симбиосомной мембраны (Perotto et al., 1995). Очевидно, что эта стадия развития сопровождается фундаментальными изменениями бактериоидов и белков наружной мембраны (Roest et al., 1995; глава 3). После этой стадии дифференцировки зрелая симбиосомная мембрана по составу липидов становится более сходной с микросомальной мембраной, чем с плазматической мембраной. По сравнению с плазматической мембраной, симбиосомная мембрана содержит больше фосфатидилэтаноламина (Hernandez, Cooke, 1996). Холин-киназа II весьма активна в инфицированных тканях клубеньков сои (Mellor et al., 1986).

Бактериальные компоненты симбиосомной мембраны и симбиосомной жидкости систематически не изучались. У сои выявлен клубенек-специфический полисахарид, синтезируемый некоторыми штаммами *B. japonicum* (Streeter et al., 1995). В симбиосомах *Neptunia natans* (Subba-Rao et al., 1995) бактериоиды упакованы в особый фибриллярный матрикс.

III.C. ОБМЕН МЕТАБОЛИТАМИ

Поскольку симбиосомная мембрана играет особую метаболическую роль и является основным мембранным компонентом инфицированных растительных клеток, неудивительно то, что она содержит продукты нескольких клубенек-специфических генов (нодулинов) (Cheon et al., 1994; Verma, Hong, 1996). Наиболее изученным примером является нодулин-26 (N-26) сои, который кодирует интегральный мембранный белок (Miao, Verma, 1993). N-26 активно экспрессируется в клубеньках сои, хотя его клубенек-специфический аналог не был выявлен у других бобовых. Этот белок кодирует-

ся геном, относящимся к древнему семейству, консервативному для бактерий и человека. Белок, гомологичный N-26, был также идентифицирован как внутренний белок тонопласта и мембран вакуолей (Maurel et al., 1993) и по меньшей мере два гомолога N-26 экспрессируются в вегетативных тканях сои, причем максимальный уровень экспрессии найден в зоне элонгации корня (Miao, Verma, 1993). Вероятно, в ходе эволюции симбиоза белок, ранее экспрессировавшийся в тканях корня, приобрел симбиотическую функцию и вошел в систему клубенек-специфического контроля. На основании гомологии различных прокариотических и эукариотических мембранных белков канального типа высказано предположение о том, что N-26 является канальным белком, который обеспечивает транспорт небольших молекул и ионов через симбиосомную мембрану. Возможно, его активность регулируется протеин-киназой, локализованной в симбиосомной мембране (Lee et al., 1995).

Конкретные функции симбиосомной мембраны в инициации и регуляции процессов биологической фиксации азота бактероидами до сих пор неясны. Одним из удивительных и малопонятных свойств симбиосомной мембраны является механизм, благодаря которому бактероиды снабжаются питательными субстратами и другими веществами, необходимыми для азотфиксации, однако при этом деление бактероидов подавлено. Симбиосомная система находится в состоянии динамического равновесия, и если процесс азотфиксации не происходит вследствие бактериальной или растительной мутации или неблагоприятных физиологических условий, бактероиды быстро стареют, после чего содержащая их растительная клетка отмирает (Kneen et al., 1990; Huang et al., 1993; Novak et al., 1995). Было предложено несколько моделей, основанных на концепции сопряженного метаболического обмена (Udvardi, Kahn, 1993) или динамического равновесия, регулируемого рН в симбиосомном компартменте (Brewin, 1991). Однако тот факт, что симбиосома постоянно включает в свой состав наполненные белками везикулы из аппарата Гольджи, до сих пор не получил должного внимания, хотя этот процесс может быть важен в связи с общей регуляцией питания бактероидов (Kardailsky et al., 1996; Dahiya et al., 1997).

III.D. АВТОЛИЗ

Изучение компонентов симбиосомного пространства показало, что симбиосома способна развиваться в литический компартмент (Mellor, 1989). Имеются биохимические доказательства наличия в ней α -маннозидаз (Kinnbach et al., 1987), протеаз и ингибиторов протеаз (Mellor et al., 1984; Manen et al., 1991). Экспрессия клубенек-специфичного гена цистеиновой протеазы в клубеньках гороха связана со старением инфекционной ткани (Kardailsky, Brewin, 1996). Накапливаются данные о том, что некоторые белки в симбиосомной жидкости могут быстро обновляться, по крайней мере, в некоторых условиях. Для клубенькового лектина гороха (Kardailsky et al., 1996; Dahiya et al., 1997) и для нодулина Npv30 *Phaseolus* (Campos et al., 1995) выявлено противоречие между высоким уровнем генных транскриптов, определяемых путем гибридизации *in situ*, и очень низким уровнем белкового антигена, который локализуется с помощью иммуноконъюгатов золота. Это показывает, что определенные белки могут очень быстро метаболизироваться в симбиосомной жидкости. Более того, в клубеньках сои искусственно индуцированное старение приводит к избирательной протеолитической деградации белков, связанных с симбиосомной мембраной (Jacobi et al., 1994).

Важно отметить, что заключительной стадией развития почти всех бактероидов в недетерминированных клубеньках является старение. Деградация симбиосомы и автолиз хозяйских клеток обычно наблюдается в наиболее старой ткани у основания клубенька (Truchet, Coulomb, 1973) и часто индуцируется в симбиотически неактивных клубеньках (Pladys, Vance, 1993; Novak et al., 1995). У травянистых бобовых с детерминированными клубеньками, например у сои (Pfeiffer et al., 1983), старение симбиосом происходит более синхронно в период созревания плодов. Возможным механизмом старения бактероидов является подкисление симбиосомной жидкости, которое может приводить к развитию симбиосомы в литическую везикулу, что индуцирует деградацию бактероидов (Brewin, 1991). Ранней стадией старения является распад симбиосомной мембраны, который происходит одновременно с утратой азотфиксирующей активности (Herrada et al., 1993). Возможно, этот распад связан с автоокислением легоглобина и последующим освобождением супероксидных ионов и перекиси водорода (Purpo et al., 1991). Для растения-хозяина распад симбиосом является выгодным:

он обуславливает рециклизацию фиксированного азота в другие части растения и кроме того предотвращает системное распространение ризобий. Однако с точки зрения бактерий этот процесс выглядит удивительным, так как эндосимбиотические бактерии в клубеньке гибнут в результате автолиза. Поэтому неясно, какие эволюционные преимущества для ризобий может иметь азотфиксация внутри клубеньков. Конечно, клубенек является для ризобий уникальной экологической нишей, но в чем же состоит селективное преимущество симбиоза, если большинство азотфиксирующих бактерий гибнет? Очевидно, что ответ на этот вопрос может быть получен при рассмотрении ризобий как колониальных эндофитов (глава 9). Известно, что в процессе инициации клубеньков заселение тканей осуществляется потомками одной или немногих бактериальных клеток (Dart, 1975). Значит, вся популяция бактерий в клубеньке представляет из себя генетически гомогенный клон. Поэтому физиологическая функция бактерий в клубеньке может рассматриваться как "альтруизм", подобный тому, который мы наблюдаем у колониальных насекомых. Другими словами, хотя азотфиксирующие бактерии и гибнут в клубеньке, их активность создает возможность для роста недифференцированных изогенных бактерий, которые занимают межклеточные пространства, инфекционные нити и инфекционные капли в клубеньке. Таким образом, заключительной стадией жизненного цикла ризобий является сапрофитный рост недифференцированных бактерий в стареющих тканях хозяина.

IV. Выводы

Многие черты бобово-ризобиального симбиоза характерны для других эволюционно продвинутых мутуалистических симбиозов. Он характеризуется прогрессивной морфологической и экологической специализацией и развитием все более тесных отношений между растением и поверхностью микробной клетки. На каждой стадии процесса инвазии ризобиями тканей и клеток могут быть обнаружены адаптивные свойства, которые обеспечивают симбиотическое взаимодействие, а также другие свойства, связанные с защитными системами хозяина и активируемые при контроле роста потенциальных патогенов. Несмотря на то, что инфекционные нити, симбиосомы и сами клубеньки бобовых являются морфологическими структурами, уникальными для симбиоза, развитие клубеньков в основном может рассматриваться как реорганизованный процесс нормального морфогенеза растительной клетки, регулируемого новыми сигналами, поступающими от ризобий. Хотя продукты некоторых растительных генов, экспрессируемые при развитии клубеньков (так называемые нодулины) являются либо уникальными для клубеньков, либо сильно активируемыми в тканях клубенька, эти гены, по-видимому, не являются новыми в эволюционном смысле, так как они имеют функциональных гомологов в других тканях и в клубеньках других бобовых, где они не получили статуса "нодулинов". Наконец, становится все более очевидным, что имеется много общих свойств, связывающих морфологию и развитие бобово-ризобиального симбиоза и других основных симбиозов у покрытосемянных, в частности, актиноризы и арбускулярной микоризы (Pawlowski, Bisseling, 1996; Gianinazzi-Pearson, 1996). Поэтому может оказаться полезным более широкое распространение терминов "симбиосома" и "симбиосомная мембрана", а не их традиционных аналогов "перибактероидная единица" и "перибактероидная мембрана".

V. Благодарности

Я благодарен за поддержку Британскому научному совету по биотехнологии и биологическим исследованиям, программа "Симбиоз и защита" (ERB FMR XCT 960039). Выражаю признательность Джанет Спрент за обсуждение сравнительной анатомии бобовых.

VI. Литература

- Ahlborn B., Werner D. (1992) *Physiol. Mol. Plant Pathol.* V. 40, p. 299-314.
Appels M.A., Haaker H. (1991) *Plant Physiol.* V. 95, p. 740-747.
Bassett B., Goodman R.N., Novacky A. (1977) *Can. J. Microbiol.* V. 23, p. 573-582.
Becker A., Neihaus K., Puhler A. (1995) *Mol. Microbiol.* V. 16, p. 191-203.
Benaben V., Due G., Lefebvre V., Huguet T. (1995) *Plant Physiol.* V. 107, p. 53-62.

- Benhamou N., Lafontaine P.J., Mazau D., Esquerre-Tugaye M.-T. (1991) *Planta*. V. 184, p. 457-467.
- Beringer J.E., Brewin N.J., Johnston A.W.B. (1980) *Heredity*. V. 45, p. 161-186.
- Bhat U.R., Mayer H., Yokota A., Hollingsworth R.I., Carison R.W. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 2155-2159.
- Blumwald E., Fortin M.G., Rea P.A., Verma D.P.S. (1985) *Plant Physiol.* V. 78, p. 665-672.
- Bolanos L., Brewin N.J., Bonilla I. (1996) *Plant Physiol.* V. 110, p. 1249-1256.
- Borisov A.Y., Morzhina E.V., Kulikova O.A., Tchetskova S.A., Lebsky V.K., Tikhonovich I.A. (1992) *Symbiosis*. V. 14, p. 297-313.
- Bradley D.J., Butcher G.W., Galfre G., Wood E.A., Brewin N.J. (1986) *J. Cell Sci.* V. 85, p. 47-61.
- Bradley D.J., Kjellbom P., Lamb C.J. (1992) *Cell*. V. 70, p. 21-30.
- Brewin N.J., Robertson J.G., Wood E.A., Wells B., Larkins A.P., Galfre G., Butcher G.W. (1985) *EMBO J.* V. 4, p. 605-611.
- Brewin N.J. (1991) *Ann. Rev. Cell Biol.* V. 7, p. 191-226.
- Campos F., Carsolio C., Kuin H., Bisseling T., Rocha-Sosa M., Sanchez F. (1995) *Plant Physiol.* V. 109, p. 363-370.
- Cheon C.I., Hong Z.L., Verma D.P.S. (1994) *J. Biol. Chem.* V. 269, p. 6598-6602.
- Cheon C.I., Lee N.G., Siddique A.B.M., Bal A.K., Verma D.P.S. (1993) *EMBO J.* V. 12, p. 4125-4135.
- Chiarello M.D., Larre C., Kedzior Z.M., Gueguen J. (1996) *J. Agric. Food Chem.* V. 44, p. 3723-3726.
- Christiansen J.H., Rosendahl L., Widell S. (1995) *J. Plant Physiol.* V. 147, p. 175-181.
- Chun J.Y., Sexton G.L., Roth L.E., Stacey G. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 6717-6729.
- Cook D., Dreyer D., Bonnet D., Howell M., Nony E., VandenBosch K.A. (1995) *Plant Cell*. V. 7, p. 43-55.
- Csanadi G., Szecsi J., Kalo P., Kiss P., Endre G., Kondorosi A., Kondorosi E., Kiss G.B. (1994) *Plant Cell*. V. 6, p. 201-213.
- Dahiya P., Kardailsky I.V., Brewin N.J. (1997) *Plant Physiol.* 115 (в печати).
- Dart P.J. (1975) J.G. Torrey, D.T. Clarkson (eds.) *The Development and Function of Roots*, Academic Press, London, N.Y., p. 467-506.
- De Boer M.H., Djordjevic M.A. (1995) *Protoplasma*. V. 185, p. 58-71.
- Dunlap J., Minami E., Bhagwat A.A., Keister D.L., Stacey G. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 546-555.
- Gamas P., de Carvalho N., Lescure N., Cullimore J.V. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 233-242.
- Garbers C., Meckbach R., Mellor R.B., Werner D. (1988) *J. Plant Physiol.* V. 132, p. 442-445.
- Gianinazzi-Pearson V. (1996) *Plant Cell*. V. 8, p. 1871-1883.
- Glazebrook J., Ichige A., Walker G.C. (1993) *Gen. Devel.* V. 7, p. 1485-1497.
- Goetting-Minesky M.P., Mullin B.C. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 91, p. 9891-9895.
- Gu X.J., Verma D.P.S. (1996) *EMBO J.* V. 15, p. 695-704.
- Hernandez L.E., Cooke D.T. (1996) *Phytochemistry*. (в печати).
- Herrada G., Puppo A., Moreau S., Day D.A., Rigaud J. (1993) *FEBS Lett.* V. 326, p. 33-38.
- Herrada G., Puppo A., Rigaud J. (1989) *J. Gen. Microbiol.* V. 135, p. 3165-3171.
- Higashi S., Kushiya K., Abe M. (1987) *Can. J. Microbiol.* V. 32, p. 947-952.
- Hong Z.G., Verma D.P.S. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 91, p. 9617-9621.
- Huang J.-S. (1986) *Ann. Rev. Phytopathol.* V. 24, p. 141-157.
- Huang S.S., Djordjevic M.A., Rolfe B.G. (1993) *Protoplasma*. V. 172, p. 180-190.
- Jacobi A., Katinakis P., Werner D. (1994) *J. Plant Physiol.* V. 144, p. 533-540.
- Jacobsen-Lyon K., Jensen E.O., Jorgensen J.-E., Marcker K.A., Peacock W.J., Dennis E.S. (1995) *Plant Cell*. V. 7, p. 213-223.
- James E.K., Sprent J.I., Minchin F.R., Brewin N.J. (1991) *Plant, Cell and Environment*. V. 14, p. 467-476.
- Kannenberg E.L., Perotto S., Bianciotto V., Rathbun E.A., Brewin N.J. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 2021-2032.
- Kannenberg E.L., Brewin N.J. (1994) *Trends in Microbiology*. V. 2, p. 277-283.
- Kardailsky I.V., Brewin N.J. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 689-695.
- Kardailsky I.V., Sherrier D.J., Brewin N.J. (1996) *Plant Physiol.* V. 111, p. 49-60.
- Kardailsky I.V., Yang W.-C., Zalensky A.O., Van Kammen A., Bisseling T. (1993) *Plant Mol. Biol.* V. 23, p. 1029-1037.
- Kijne J.W. (1992) G. Stacey, R.H. Burris, H.J. Evans (eds.) *In: Biological Nitrogen Fixation*, Chapman and Hall, NY, London, pp. 349-398.
- Kinnbach A., Mellor R.B., Werner D. (1987) *J. Exp. Bot.* V. 38, p. 1373-1377.
- Kneen B.E., LaRue T.A., Hirsch A.M., Smith C.A., Weeden N.F. (1990) *Plant Physiol.* V. 94, p. 899-905.
- Kouchi H., Hata S. (1993) *Mol. Gen. Genet.* V. 238, p. 106-119.
- Kumarasinghe R.M.K., Nutman P.S. (1977) *J. Exp. Bot.* V. 28, p. 961-976.
- Kuster H., Quandt H.J., Broer I., Perlick A.M., Puhler A. (1995) *Plant Mol. Biol.* V. 29, p. 759-772.
- Kuster H., Schroder G., Fruhling M., Pich U., Rieping M., Schubert I., Perlick A.M., Puhler A. (1995) *Plant Mol. Biol.* V. 28, p. 405-421.
- Lee J.W., Zhang Y.X., Weaver C.D., Shomer N.H., Louis C.F., Roberts D.M. (1995) *J. Biol. Chem.* V. 270, p. 27051-27057.
- Leigh J.A., Walker G.C. (1994) *Trends Genet.* V. 10, p. 63-67.
- Lloyd C.W., Pearce K.J., Rawlins D.J., Ridge R.W., Shaw P.J. (1987) *Cell Motil. Cytoskeleton*. V. 8, p. 27-36.
- Long S.R. (1996) *Plant Cell*. V. 8, p. 1885-1898.
- Manen J.F., Simon P., Slooten J.C., Osteras M., Frutiger S., Hughes G.J. (1991) *Plant Cell*. V. 3, p. 259-270.
- Maurel C., Reizer J., Schroeder J.I., Chrispeels M.J. (1993) *EMBO J.* V. 12, p. 2241-2247.
- Mellor R.B. (1989) *J. Exp. Bot.* V. 40, p. 831-839.
- Mellor R.B., Christensen T.M.I.E., Werner D. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 83, p. 659-663.
- Mellor R.B., Morschel E., Werner D. (1984) *Z. Naturforsch.* V. 39c, p. 123-125.
- Miao G.-H., Verma D.P.S. (1993) *Plant Cell*. V. 5, p. 781-794.
- Miller I.M., Baker B.D. (1986) *Protoplasma*. V. 131, p. 82-91.

- Morrison N., Verma D.P.S. (1987) *Plant Mol. Biol.* V. 9, p. 185-196.
- Muller P., Ahrens K., Keller T., Klauke A. (1995a) *Mol. Microbiol.* V. 18, p. 831-840.
- Muller P., Klauke A., Wegel P. (1995b) *Planta*. V. 197, p. 163-175.
- Niehaus K., Kapp D., Puhler A. (1993) *Planta*. V. 190, p. 415-425.
- Noel K.D., VandenBosch K.A., Kulpaca B. (1986) *J. Bacteriol.* V. 168, p. 1392-1401.
- Novak K., Pesina K., Nebesarova J., Skrdela V., Lisa L., Nasinec V. (1995) *Ann. Bot.* V. 76, p. 303-315.
- Ouyang L.-J., Day D.A. (1992) *Plant Physiol. Biochem.* V. 30, p. 613-623.
- Ozga D.A., Lara J.C., Leigh J.A. (1994) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 758-765.
- Pawlowski K., Bisseling T. (1996) *Plant Cell*. V. 8, p. 1899-1913.
- Perlick A.M., Fruhling M., Schroder G., Frosch S.C., Puhler A. (1996) *Plant Physiol.* V. 110, p. 147-154.
- Perotto S., Brewin N.J., Kannenberg E.L. (1994) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 99-112.
- Perotto S., Donovan N., Drobak B.K., Brewin N.J. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 560-568.
- Perotto S., VandenBosch K.A., Butcher G.W., Brewin N.J. (1991) *Development*. V. 112, p. 763-773.
- Pfeiffer N.E., Torres C.M., Wagner F.W. (1983) *Plant Physiol.* V. 71, p. 797-802.
- Pladys D., Vance C.P. (1993) *Plant Physiol.* V. 103, p. 379-384.
- Price G.D., Day D.A., Gresshoff P.M. (1987) *J. Plant Physiol.* V. 130, p. 157-164.
- Puppo A., Herrada G., Rigaud J. (1991) *Plant Physiol.* V. 96, p. 826-830.
- Quandt J., Hillemann A., Niehaus K., Arnold W., Puhler A. (1992) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 5, p. 420-427.
- Rae A.L., Bonfante-Fasolo P., Brewin N.J. (1992) *Plant J.* V. 2, p. 385-395.
- Rae A.L., Perotto S., Knox J.P., Kannenberg E.L., Brewin N.J. (1991) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 4, p. 563-570.
- Reuhs B.L., Williams M.N.V., Kim J.S., Carlson R.W., Cote F. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 4289-4296.
- Ribeiro A., Akkermans A.D.L., Van Kammen A., Bisseling T., Pawlowski K. (1995) *Plant Cell*. V. 7, p. 785-794.
- Rice S.J., Grant M.R., Reynolds P.H.S., Farnden K.J.F. (1993) *Plant Sci.* V. 90, p. 155-166.
- Robertson J.G., Lyttleton P., Bullivant S., Grayston G.F. (1978) *J. Cell Sci.* V. 30, p. 129-149.
- Robertson J.G., Wells B., Brewin N.J., Wood E.A., Knight C.D., Downie J.A. (1985) *J. Cell Sci. Suppl.* V. 2, p. 317-331.
- Roest H.P., Goosen-de-Roo L., Wijffelman C.A., de Maagd R.A., Lugtenberg B.J.J. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 14-22.
- Rolfe B.G., Carlson R.W., Ridge R.W., Dazzo F.B., Matcos P.P., Pankhurst C.E. (1996) *Austral. J. Plant Physiol.* V. 23, p. 285-303.
- Rosendahl L., Dilworth M.J., Glenn A.R. (1992) *J. Plant Physiol.* V. 139, p. 635-638.
- Roth L.E., Stacey G. (1989a) *Europ. J. Cell Biol.* V. 49, p. 24-32.
- Roth L.E., Stacey G. (1989b) *Europ. J. Cell Biol.* V. 49, p. 13-23.
- Salzwedel J.L., Dazzo F.B. (1993) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 6, p. 127-134.
- Scheres B., Van de Weil C., Zalensky A., Horvath B., Spink H., Van Eck H., Zwartkruis F., Wolters A.-M., Gloudemans T., Van Kammen A., Bisseling T. (1990a) *Cell*. V. 60, p. 281-294.
- Scheres B., van Engelen F., van der Knaap E., van de Wiel C., Van Kammen A., Bisseling T. (1990b) *Plant Cell*. V. 2, p. 687-700.
- Schlaman H.R.M., Horvath B., Vijgenboom E., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 4277-4287.
- Sharma S.B., Signer E.R. (1990) *Gen. Devel.* V. 4, p. 344-356.
- Sherrier D.J., VandenBosch K.A. (1994) *Protoplasma*. V. 183, p. 148-161.
- Stacey G., So J.-S., Roth L.E., Lakshmi S.K.B., Carlson R.W. (1991) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 4, p. 332-340.
- Streeter J.G. (1991) *Adv. Bot. Res.* V. 18, p. 129-187.
- Streeter J.G. (1995) *Symbiosis*. V. 19, p. 175-196.
- Streeter J.G., Peters N.K., Salminen S.O., Pladys D., Zhao P. (1995) *Plant Physiol.* V. 107, p. 857-864.
- Szafran M.M., Haaker H. (1995) *Plant Physiol.* V. 108, p. 1227-1232.
- Tipping A.J., McPherson M.J. (1995) *J. Biol. Chem.* V. 270, p. 16939-16946.
- Truchet G.L., Coulomb P. (1973) *J. Ultrastr. Res.* V. 43, p. 36-57.
- Turgeon B.G., Bauer W.D. (1985) *Planta*. V. 163, p. 328-349.
- Tyerman S.D., Whitehead L.F., Day D.A. (1995) *Nature*. V. 378, p. 629-632.
- Udvardi M.K., Day D.A. (1989) *Plant Physiol.* V. 90, p. 982-987.
- Udvardi M.K., Kahn M.L. (1993) *Symbiosis*. V. 14, p. 87-101.
- Udvardi M.K., Yang L.-J.O., Young S., Day D.A. (1990) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 3, p. 334-340.
- Van Brussel A.A.N., Bakhuizen R., van Spronsen P.C., Spink H.P., Tak T., Lugtenberg B.J.J., Kijne J.W. (1992) *Science*. V. 257, p. 70-72.
- Van Spronsen P.C., Bakhuizen R., Van Brussel A.A.N., Kijne J.W. (1994) *Eur. J. Cell Biol.* V. 64, p. 88-94.
- VandenBosch K.A., Bradley D.J., Knox J.P., Perotto S., Butcher G.W., Brewin N.J. (1989) *EMBO J.* V. 8, p. 335-342.
- Vasse J., de Billy F., Truchet G. (1993) *Plant J.* V. 4, p. 555-566.
- Verma D.P.S., Cheon C.I., Hong Z.L. (1994) *Plant Physiol.* V. 106, p. 1-6.
- Verma D.P.S., Hong Z.L. (1996) *Trends Microbiol.* 4, 364-368.
- Vijn I., Martinez-Abarca F., Yang W.C., das Neves L., Van Brussel A.A.N., Van Kammen A., Bisseling T. (1995) *Plant J.* 8, 111-119.
- Werner D., Mellor R.B., Hahn M.G., Grisebach H. (1985) *Z. Naturforsch.* 40c, 179-181.
- Wexler M., Gordon D., Murphy P.J. (1995) *Soil Biol. Biochem.* 27, 531-537.
- Whitehead L.F., Tyerman S.D., Salom C.L., Day D.A. (1995) *Symbiosis*. 19, 141-154.
- Yang L.-J.O., Udvardi M.K., Day D.A. (1990) *Planta*. 182, 437-444.

Контроль симбиотической фиксации азота ризобиями

Камински П., Батут Ж., Боистард П.

I.	Введение.....	465
II.	Синтез и активность нитрогеназы.....	466
	II.A. Идентификация и функции генов азотфиксации.....	467
	II.A.1. <i>nif</i> -гены.....	467
	II.A.2. <i>fix</i> -гены.....	468
	II.B. Организация <i>nif</i> - и <i>fix</i> -генов.....	469
	II.C. Азотфиксация в чистых культурах.....	469
III.	Симбиотическая азотфиксация.....	471
	III.A. Азотфиксация в состоянии симбиоза и дифференцировка бактериоидов.....	471
	III.B. Физиология азотфиксирующего бактериоида.....	472
	III.B.1. Метаболизм кислорода в бактериоидах.....	472
	III.B.2. Углеродный обмен в бактериоидах.....	475
	III.B.3. Азотный обмен в симбиосомах.....	476
	III.C. Генетика дифференцировки бактериоидов.....	479
	III.C.1. Репликация ДНК и клеточные деления.....	479
	III.C.2. Репрессия генов клубенькообразования.....	479
	III.C.3. Репрессия гена <i>ropA</i>	479
	III.C.4. <i>VasA</i> – возможный регулятор развития бактериоидов.....	480
IV.	Регуляция генов азотфиксации.....	480
	IV.A. Компоненты путей регуляции.....	481
	IV.A.1. Транскрипционный активатор <i>NifA</i>	482
	IV.A.2. Альтернативный фактор сигма-54.....	482
	IV.A.3. Двухкомпонентная регуляторная система <i>FixL/J</i>	482
	IV.A.4. <i>FixK</i> – фактор, гомологичный <i>Fnr</i>	484
	IV.A.5. <i>NtrB/C</i> – сенсорная система, регулирующая азотный статус.....	484
	IV.A.6. <i>NrfA</i> : новая функция старого гена.....	485
	IV.B. Сравнение путей регуляции <i>nif</i> - и <i>fix</i> -генов.....	485
	IV.C. Контроль экспрессии генов азотфиксации при симбиозе.....	486
V.	Заключение и перспективы.....	486
	V.A. Симбиотические функции бактериоидов.....	486
	V.B. Сигналы, контролирующие развитие и метаболизм клубеньков.....	487
	V.C. Пути регуляции.....	487
VI.	Благодарности.....	488
VII.	Литература.....	488

I. Введение

Способность восстанавливать молекулярный азот (N_2) до аммиака (NH_3) не является уникальным свойством ризобий. Она обнаружена в различных группах прокариот, однако у эукариот отсутствует (Young, 1992). Свойства нитрогеназного комплекса, осуществляющего разрыв прочной связи в молекуле N_2 , весьма консервативны. Об этом говорят, например, результаты изуче-

ния структуры нитрогеназного комплекса у столь отдаленных микробов как *Azotobacter vinelandii* и *Clostridium pasteurianum* (Smith et al., 1995). Консервативность нитрогеназного комплекса является результатом давности его происхождения: после возникновения у древнейших прокариот этот комплекс был передан большинству современных азотфиксирующих микроорганизмов путем “вертикального” наследования. Однако некоторые бактерии могли приобретать способность к азотфиксации и путем горизонтального переноса генов, кодирующих нитрогеназный комплекс.

Консервативность нитрогеназного комплекса не дает оснований надеяться на то, что механизмы симбиотической азотфиксации могут быть полностью изучены на моделях свободноживущих микроорганизмов. Это связано с чрезвычайной специфичностью условий, в которые попадают азотфиксирующие бактерии при формировании симбиоза. Симбиотические бактерии претерпели сложную коэволюцию со своими растениями-хозяевами, в результате которой возник целый ряд особых механизмов регуляции азотфиксации *in planta*, включая дифференцировку бактериоидов. Бактериоиды находятся в растительных клетках внутри специальных мембран, образуя в совокупности с ними симбиосому, которая может считаться аналогом клеточной органеллы. В то же время, коэволюция с растениями не привела к потере бактериями способности к самостоятельному существованию, в процессе которого некоторые ризобии могут, как и при симбиозе, фиксировать азот.

Изучение симбиотической азотфиксации имеет большое практическое значение: N_2 , зафиксированный в клубеньках бобовых, играет важную роль в азотном балансе естественных экосистем и агроценозов. Поэтому очевидно, что задача повышения интенсивности симбиотической азотфиксации не может быть решена без изучения специфических механизмов, регулирующих этот процесс при симбиозе. В настоящее время эта задача решается для всех основных форм ризобий, относящихся к родам *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* и *Azorhizobium* (Глава 1).

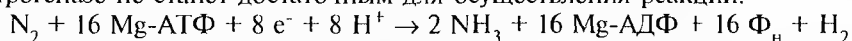
В данной главе будут рассмотрены бактериальные гены и функции, обеспечивающие азотфиксацию, а участие в этом процессе растения-хозяина иллюстрируется рисунком 3. Сначала мы рассмотрим биохимические механизмы восстановления молекулярного азота (N_2) до аммиака (NH_3), а также синтез и ключевые свойства нитрогеназного комплекса, контролирующего этот процесс. Хотя у разных азотфиксаторов нитрогеназная реакция протекает во многом одинаково, у ризобий выявлены особые гены (*fixABCX*, *fdxN*), необходимые для азотфиксации и работающие совместно с консервативными *nif*-генами, но не имеющие гомологов у несимбиотических бактерий. Затем мы перейдем к рассмотрению дифференцировки бактериоидов, так как в этих глубоко молифицированных формах бактерий создаются особые условия, обеспечивающие высокоэффективную азотфиксацию в условиях симбиоза. В конце главы мы обратимся к механизмам регуляции синтеза и активности нитрогеназы, которые у свободноживущих бактерий и ризобий различаются в наибольшей степени.

II. Синтез и активность нитрогеназы

У всех азотфиксирующих микроорганизмов восстановление N_2 до NH_3 катализируется ферментом нитрогеназой, имеющим консервативную структуру. Долгое время считалось, что все нитрогеназы содержат молибден, однако у свободноживущего diaзотрофа *Azotobacter* были выявлены альтернативные нитрогеназы, в которых молибден замещен ванадием или железом (Bishop, Premakumar, 1992). У ризобий безмолибденовые нитрогеназы пока не выявлены.

Нитрогеназный комплекс состоит из 2 компонентов. Первый из них (компонент I) называется динитрогеназой или FeMo-содержащим белком и представляет собой гетеротетрамер $\alpha_2\beta_2$, имеющий молекулярную массу около 220 кДа и содержащий 4 Р-кластера Fe_4S_4 , а также кофактор, содержащий молибден и железо и представляющий собой каталитический сайт для восстановления N_2 . Компонент II (редуктаза нитрогеназы) представляет собой гомодимер (γ_2), который имеет массу около 60 кДа и содержит железо в составе единичного кластера Fe_4S_4 . Выяснение пространственной структуры нитрогеназы у *Azotobacter vinelandii* и *Clostridium pasteurianum* позволило создать модели, описывающие процесс разрыва тройной связи в молекуле N_2 (Smith et al., 1995).

Редуктаза динитрогеназы в условиях *in vivo* восстанавливается различными донорами электронов, имеющими низкий потенциал. Затем электроны переносятся на динитрогеназу, что требует гидролиза Mg-АТФ. Этот процесс продолжается до тех пор, пока количество электронов на динитрогеназе не станет достаточным для осуществления реакции:



Приведенное уравнение отражает одно из основных свойств нитрогеназной реакции - ее высокую энергоемкость, связанную с необходимостью разрыва прочной тройной связи в молекуле N_2 . При переносе каждого электрона на динитрогеназу осуществляется гидролиз 2 молекул АТФ. Энергоемкость азотфиксации увеличивается еще и тем, что при восстановлении каждой молекулы N_2 два протона теряется на образование молекулы H_2 . Поэтому наибольшую интенсивность азотфиксации могут развивать те микроорганизмы, которые взаимодействуют с растениями и используют продукты их фотосинтеза для поддержания нитрогеназной реакции.

Другая ключевая особенность нитрогеназы - ее чувствительность к кислороду, связанная в основном с компонентом II. Поэтому азотфиксация происходит в анаэробных или микроаэрофильных условиях, а аэробные азотфиксаторы, такие как ризобии, нуждаются в защите нитрогеназы от кислорода (Hill, 1992).

II.A. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФУНКЦИИ ГЕНОВ АЗОТФИКСАЦИИ

Выявление и характеристика генов азотфиксации ризобий в значительной степени базировалась на данных, полученных при изучении свободноживущего азотфиксатора *Klebsiella pneumoniae*. У него выявлено более 20 *nif*-генов, для которых определено положение на хромосоме (кластер размером 24 т.п.н. вблизи гистидинового оперона) и расшифрованы нуклеотидные последовательности (Gussin et al., 1986; Arnold et al., 1988; Merrick, 1992; Dean, Jacobson, 1992).

С использованием проб, содержащих фрагменты структурных генов нитрогеназы (*nifH*, *nifD*), была показана высокая консервативность этих генов у разных азотфиксаторов, включая ризобии (Ruvkun, Ausubel, 1980). Первыми ризобиями, у которых были клонированы *nif*-гены, стали симбионты люцерны, в геноме которых был выявлен кластер, содержащие существенные для азотфиксации гены (Ruvkun et al., 1981, 1982). Этот кластер содержит ряд *nif*-генов, имеющих гомологов у *K. pneumoniae*, а также *fix*-гены, не имеющие гомологов у этой бактерии.

II.A.1. *nif*-гены

К настоящему времени у ризобий выявлено 10 *nif*-генов, имеющих гомологов у *K. pneumoniae*. В первую очередь, это структурные гены нитрогеназы, кодирующие большую (*nifD*, *nifK*) и малую (*nifH*) ее субъединицу. Для полной сборки нитрогеназы необходимы и другие *nif*-гены, в частности *nifB*, *nifE*, *nifN*, участвующие в биосинтезе FeMo-кофактора. Сходство нуклеотидных последовательностей, выявленное при сопоставлении белков NifE-NifD и NifN-NifK показывает, что NifE и NifN могут формировать гетеротетрамерный комплекс, сходный с большой субъединицей нитрогеназы (Brigle et al., 1987; Aguilar et al., 1987, 1990). Возможно, что этот комплекс служит молекулярной матрицей при синтезе FeMo-кофактора, тогда как белок NifB участвует в сборке кофактора на этой матрице (Paustian et al., 1989). Поскольку обе субъединицы нитрогеназы содержат ионы металлов, возможно, что функции некоторых *nif*-генов связаны с поглощением железа и серы. Действительно, белок NifS *Azotobacter vinelandii* проявляет десульфурилазную активность, которая может быть важна для формирования металл-содержащих кофакторов (Zheng et al., 1993). Встройка транспозона Tn5 в ген *nifS* *B. japonicum* приводит к резкому (до 30% от уровня дикого типа) снижению нитрогеназной активности (Ebeling et al., 1987). Возможно, что у этой бактерии функция NifS может частично выполняться другим ферментом.

Белок NifW абсолютно необходим для проявления азотфиксирующей активности *A. caulinodans*, хотя у *K. pneumoniae* и *A. vinelandii* инактивация NifW приводит лишь к частичному ее снижению. Этот белок взаимодействует с большой субъединицей нитрогеназы, образуя с ней высокомолекулярный комплекс (Kim, Burgess, 1996). В бесклеточных экстрактах этот комплекс образуется только в аэробных условиях, что может говорить об участии белка NifW в защите нитрогеназы от кислоро-

да. Кроме того, у ризобий выявлены два регуляторных гена: *nifA* участвует в активации транскрипции *nif*-оперонов (раздел IV), тогда как *nifX*, выявленный у *B. japonicum* (Hennecke, 1990), может играть роль в негативной регуляции, как это показано для *K. pneumoniae* (Gosink et al., 1990).

При полном секвенировании Sym-плазмиды штамма NGR234 *Rhizobium* sp. (Freiberg et al., 1997) были выявлены последовательности, гомологичные генам *nifQ* и *nifZ*, которые могут присутствовать и у других ризобий. Однако, у ризобий отсутствуют гены *nifL*, *nifF*, *nifJ*, известные для *K. pneumoniae*. Белок NifL представляет собой флавопротеин, являющийся антагонистом NifA при репрессии *nif*-генов кислородом и связанным азотом (Hill et al., 1996). Однако у ризобий особенностью белка NifA является чувствительность к кислороду, которая не зависит от присутствия NifL (раздел IV). Гены *nifF* и *nifJ* кодируют, соответственно, флаводоксин и пируват-флаводоксин оксидоредуктазу, которые у *K. pneumoniae* переносят электроны с пирувата на железо-содержащий белок нитрогеназы. Однако у ризобий пируват не является донором электронов, поступающих на нитрогеназу.

II.A.2. *fix*-гены

Гены *fixABCX* были впервые выявлены у *R. meliloti* благодаря тесному сцеплению с *nif*-генами, а также тому, что мутанты по *fix*-генам образуют не фиксирующие азот (Fix⁻) клубеньки (Dusha et al., 1987; Earl et al., 1987). Гомологи генов *fixABCX* были найдены у *B. japonicum* (Fuhrmann et al., 1985; Gubler, Hennecke, 1986), *R. leguminosarum* bv. *viceae* (Gronger et al., 1987), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Iismaa, Watson, 1987), *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Michiels, Vanderleyden, 1993) и *A. caulinodans* (Arigoni et al., 1991). Мутанты по любому из этих 4 генов не способны к азотфиксации при симбиозе, а в случае *A. caulinodans* – и в чистой культуре.

Полная нуклеотидная последовательность *fixABCX* определена у *R. meliloti*, *A. caulinodans* и *B. japonicum* (Earl et al., 1987; Arigoni et al., 1991; Weidenhaupt et al., 1996), а частичная последовательность известна для *R. leguminosarum* (Gronger et al., 1987; Michiels, Vanderleyden, 1993). Анализ аминокислотных последовательностей позволил выявить существенное сходство продуктов генов *fixA* и *fixB* с α - и β -субъединицами электрон-транспортного флавопротеина человека (Arigoni et al., 1991; Finocchiaro et al., 1993). Белок FixC содержит консервативную последовательность, найденную в белках, связывающих НАД и ФАД (Arigoni et al., 1991) и проявляет сходство с транспортной флавопротеин-убихинон оксидоредуктазой человека (Goodman et al., 1994). Белок FixX гомологичен ферридоксин-подобным белкам (Earl et al., 1987; Gubler, Hennecke, 1986). Биохимические функции продуктов генов *fixABCX* окончательно не установлены, однако приведенные выше данные показывают, что они могут составлять цепь транспорта электронов к нитрогеназе и быть функциональными аналогами белков NifF и NifJ *K. pneumoniae*. Этой гипотезе противоречат данные о том, что дитионит – искусственный донор электронов – не восстанавливает азотфиксирующую активность мутантов *A. caulinodans* по генам *fixA*, *fixC* и *fixX* (Kaminski et al., 1988; Arigoni, 1992). Однако отсутствие в этих опытах азотфиксирующей активности может быть связано с нестабильностью компонентов нитрогеназы при нарушении цепи транспорта электронов.

Весьма вероятно, что белки FixABCX участвуют в восстановительных процессах у аэробных diaзотрофов, так как их гомологи найдены у *Azospirillum brasilense* (Fogher et al., 1985; Galimand et al., 1989), *Azotobacter chroococcum*, *A. vinelandii* (Evans et al., 1988). Секвенирование хромосомы *E. coli* позволило выявить гены *fixABCX* в районе 0–2.4 мин. (Yura et al., 1992), который может быть вовлечен в метаболизм карнитина (Eichler et al., 1995).

У *R. meliloti* и *B. japonicum* выявлены гены *frxA* и *fdxN*, однако только второй из них оказался необходимым для симбиотической азотфиксации (Ebeling et al., 1988; Klipp et al., 1989). Белок FdxN может участвовать в транспорте электронов к нитрогеназе, поскольку в опытах *in vitro* было показано, что у *R. meliloti* этот белок может служить донором электронов для нитрогеназы *Rhodobacter capsulatus* (Riedel et al., 1995). Альтернативная гипотеза, основанная на сцеплении *fdxN* с *nifB*, предполагает участие белка FdxN в восстановительном этапе созревания FeMo-кофактора нитрогеназы, однако для обсуждения этой гипотезы пока не хватает биохимических данных (Klipp et al., 1989).

II.B. ОРГАНИЗАЦИЯ *NIF*- И *FIX*-ГЕНОВ

У *K. pneumoniae* *nif*-гены “упакованы” в один компактный хромосомный кластер, тогда как у ризобий *nif*- и *fix*-гены могут составлять несколько кластеров, разбросанных по геному. У *R. meliloti*, *R. leguminosarum*, *R. etli* и *Rhizobium* sp. NGR234 гены, контролирующие основные симбиотические функции (образование клубеньков и азотфиксацию), находятся на крупномолекулярных Sym-плазмидах, размер которых может превышать 1000 т.п.н., тогда как у *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* и *Mesorhizobium* эти гены расположены на хромосомах (глава 2). У *R. meliloti*, как и у *K. pneumoniae*, *nif*-кластер содержит все выявленные *nif*-гены. Однако между генами *nifE* и *nifN* расположен оперон *nodABC*, кодирующий образование клубеньков. У *R. leguminosarum* bv. *viciae* и bv. *trifolii* относительное расположение *nif*- и *fix*-генов такое же, как у *R. meliloti*, тогда как относительное расположение *nod*-генов варьирует, хотя они всегда сцеплены с *nif*-генами (Iismaa, Watson, 1989). У *A. caulinodans* и *B. japonicum* *nif(fix)*-гены составляют не менее двух крупных хромосомных кластеров (рис. 1).

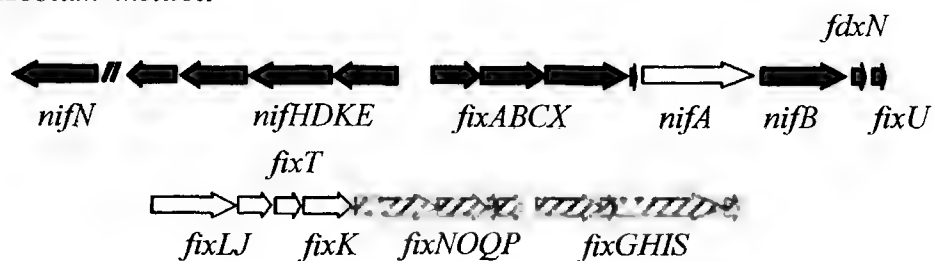
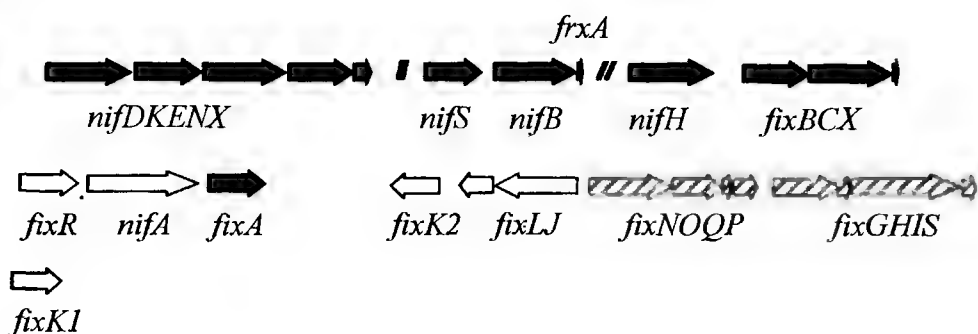
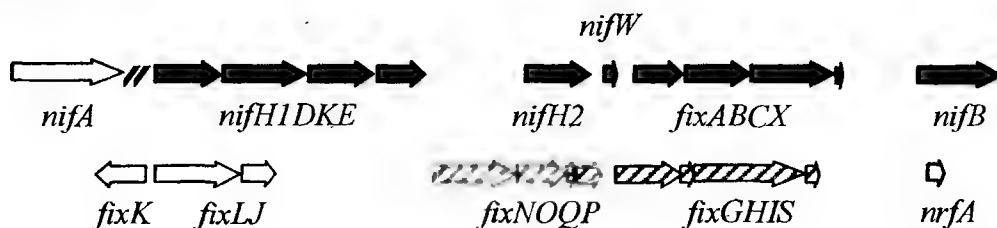
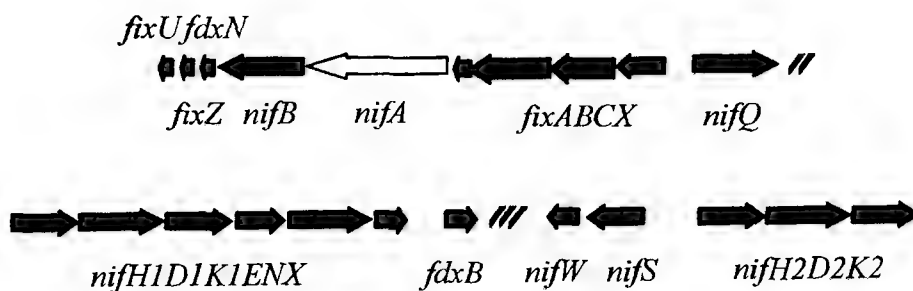
Большинство *nif(fix)*-генов организовано в опероны, состав которых варьирует у разных видов. Так, у *R. meliloti* гены *nifH* и *nifD* транскрибируются совместно с *nifK*, *nifE*, ORF110 и *nifN* (Corbin et al., 1982; Ruvkun et al., 1982; Aguilar et al., 1987, 1990), тогда как у *A. caulinodans* общая транскрипционная единица имеет состав *nifHDKE* (Elmerich et al., 1982; Denefle et al., 1987). У *B. japonicum*, а также у медленнорастущих симбионтов *Vigna* и *Parasponia*, *nifH* транскрибируется отдельно от *nifDK*, которые составляют общий оперон с *nifE*, *nifN* и *nifX* (Scott et al., 1983; Kaluza et al., 1983; Fisher, Hennecke, 1984; Kaluza, Hennecke, 1984; Yun, Szalay, 1984; Hennecke, 1990). Гены *fixABCX* составляют общую единицу транскрипции у всех ризобий за исключением *B. japonicum*, у которых *fixA* и *fixBCX* — разные опероны (Earl et al., 1987; Gubler, Hennecke, 1988; Gubler et al., 1989; Arigoni et al., 1992). Ген *nifA* может транскрибироваться как отдельная единица у *A. caulinodans* (Ratet et al., 1989) или как часть оперона: *fixRnifA* у *B. japonicum* или *nifABfdxN* у *R. meliloti* (Buikema et al., 1987; Klipp et al., 1989).

У некоторых ризобий выявлены множественные копии гена *nifH*: *R. etli* имеет 3 идентичные копии, тогда как копии *nifH1* и *nifH2* у *A. caulinodans* различаются по 6 нуклеотидам (Quinto et al., 1982, 1985; Norel, Elmerich, 1987). Все эти копии кодируют функционально активные белки, участвующие в азотфиксации, а их высокое сходство или даже идентичность говорит о том, что многокопийность гена *nifH* является результатом дупликаций, а не горизонтального переноса. Эта многокопийность может играть роль в адаптации ризобий к фиксации азота в различных экологических условиях (Valderrama et al., 1996). Нельзя исключить и того, что некоторые из копий *nifH* могут выполнять редуказные функции в биохимических процессах, не связанных с азотфиксацией.

II.C. АЗОТФИКСАЦИЯ В ЧИСТЫХ КУЛЬТУРАХ

Долгое время считалось, что ризобии фиксируют азот только в состоянии симбиоза. Однако, затем у медленнорастущих симбионтов сои и вигны была выявлена нитрогеназная активность в чистой культуре (Keister, 1975; McComb et al., 1975; Pagan et al., 1975). Ацетилен-редуктазная активность в чистых культурах *R. leguminosarum* была выявлена для штаммов TA101 (Kurze, LaRue, 1975) и 128C30 (Stam et al., 1983), а также для *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) (Bender et al., 1986), однако только у штамма INP110 она достигала уровня, сопоставимого с *Bradyrhizobium*. Несимбиотическая нитрогеназная активность проявлялась у ризобий при низком содержании в атмосфере кислорода (0.1%) и в присутствии глутамата, который мог служить источником азота, не подавляя активность нитрогеназы. Однако все эти бактерии не способны к diaзотрофному росту, то есть не могут использовать N_2 как единственный источник азота.

В начале 80-х годов в Сенегале был выделен штамм ризобий ORS571 (позднее классифицированный в новый вид, *Azorhizobium caulinodans*), обладавший необычными свойствами. Во-первых, он формировал клубеньки на стеблях тропического бобового растения *Sesbania rostrata*. Во-вторых, он был истинным diaзотрофом, то есть мог использовать N_2 как единственный источник азота для своего роста на безазотной среде (Elmerich et al., 1982; Dreyfus et al., 1983). Ацетилен-

Rhizobium meliloti*Bradyrhizobium japonicum**Azorhizobium caulinodans**Rhizobium sp. NGR234*Рисунок 1. Организация *nif*- и *fix*-генов ризобий.

редуктазная активность штамма ORS571 составила около 2000 нМ C_2H_2 на мг сухого веса бактерий в час, то есть была сходной с активностью других свободноживущих diaзотрофов и намного большей, чем у *Bradyrhizobium*.

Способность *A. caulinodans* к diaзотрофному росту может быть связана с его необычайно высокой устойчивостью к кислороду: способность к азотфиксации сохраняется при 12 мкМ кислорода, тогда как у *B. japonicum* CB576 предельной является концентрация кислорода 1 мкМ. Такая устойчивость процесса азотфиксации к кислороду может быть связана с наличием у *A. caulinodans* нескольких терминальных оксидаз, обеспечивающих высокую интенсивность дыхания (Kitts, Ludwig, 1994; Kaminski et al., 1996). Интенсивная дыхательная активность может обеспечивать синтез больших количеств АТФ, что также важно для поддержания diaзотрофного роста. Другое существенное различие *A. caulinodans* и *B. japonicum* состоит в том, что второй вид выбрасывает из клеток около 90% фиксированного азота, а первый — не обладает этим свойством (Gebhardt et al., 1984; Ludwig, 1984). Кроме того, эти виды различаются по ряду физиологических признаков и не являются таксономически родственными (Dreyfus et al., 1988). По-видимому, *A. caulinodans* может рассматриваться как diaзотроф, который относительно недавно приобрел способность формировать клубеньки.

III. Симбиотическая азотфиксация

Азотфиксация в клубеньках бобовых осуществляется особыми симбиотическими формами бактерий — бактериоидами. Однако изменения, происходящие при дифференцировке бактериоидов, не могут быть сведены только к синтезу нитрогеназы. Поэтому в данном разделе мы уделим внимание кислородному статусу, а также азотному и углеродному обмену бактериоидов. Поскольку бактериоиды и содержащие их растительные клетки тесно интегрированы, мы кратко рассмотрим особенности экспрессии растительных генов, обеспечивающих эту интеграцию. И наконец будут показаны особенности регуляции метаболических процессов в бактериоидах, связь которых с азотфиксацией ясна далеко не всегда.

III.A. АЗОТФИКСАЦИЯ В СОСТОЯНИИ СИМБИОЗА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА БАКТЕРИОИДОВ

Первые работы по изучению дифференцировки бактериоидов были выполнены более ста лет назад. Результаты изучения бактериоидов люцерны, а также тканевой структуры содержащих их клубеньков, обобщены в специальном обзоре (Vasse et al., 1990). Достоинством этих клубеньков как объекта для цитологических исследований является недетерминированный рост, обусловленный стабильной апикальной меристемой. Наиболее молодые и малодифференцированные растительные клетки находятся в дистальной (по отношению к корню) части, а по мере продвижения в проксимальном направлении степень их дифференцированности возрастает. Обычно в клубеньках люцерны выделяют 4 гистологические зоны (рис. 2А).

Апикальная зона I — это собственно меристема, клетки которой не содержат бактерий. Она формируется во внутреннем кортексе корня под действием Nod-факторов — растительных морфогенов, синтезируемых ризобиями (глава 20). У люцерны или гороха меристема сохраняет активность до конца жизни клубенька, обеспечивая его рост и возникновение клеток, которые потом будут инфицированы ризобиями.

В зоне II наблюдается рост инфекционных нитей, содержащих бактерии, которые затем проникают в растительные клетки и окружаются перибактероидными мембранами. Поэтому данную зону обычно называют зоной инфекции или префиксации, поскольку фиксация азота в ней еще отсутствует. Бактерии, только что освободившиеся из инфекционных нитей, иногда называют бактериоидами I-го типа, поскольку внешне они мало отличаются от свободноживущих бактерий (рис. 2В). В проксимальной части зоны II выявляются бактериоиды 2-го типа, у которых еще сохраняется палочковидная форма, однако нуклеоид перестает выявляться (рис. 2С). На этой ранней стадии дифференцировки происходят два важных изменения. Во-первых, полностью бло-

кируется деление бактериоидов. Во-вторых, репликация ДНК, пройдя несколько туров, также останавливается. У бактериоидов *R. leguminosarum* bv. *viciae* выявляется 7-кратное повышение количества общего белка на клетку, однако доля белков "домашнего хозяйства" при этом не меняется (Schlaman et al., 1991).

Далее следует очень узкая (3-4 слоя клеток) интерзона (II-III), которую выявляют по наличию большого количества амилопластов (рис. 2С). Формирование этой зоны является важным показателем зрелости клубенька. В ней выявляются бактериоиды 3-го типа, которые характеризует удлиненная форма и более чем в 7 раз увеличенный размер (по сравнению с бактериоидами 1-го типа). У бактериоидов 3-го типа вновь начинает выявляться микрогетерогенность цитоплазмы, в том числе электронно-плотные зоны. На молекулярном уровне этот этап дифференцировки знаменуется началом транскрипции *nif*- и *fix*-генов, хотя бактериоиды еще не фиксируют азот (Vasse et al., 1990; Yang et al., 1991; Soupene et al., 1995). Параллельно в растительных клетках начинается синтез "поздних" нодулинов, например леоглобина или белка PsNod6 (de Billy et al., 1991; Franssen et al., 1992; Kardailsky et al., 1993). При этом наблюдают репрессию синтеза ряда белков, например PsEnod5 в растительных клетках (Franssen et al., 1992) и *gorA* в клетках бактерий. Обычно эти изменения начинаются очень резко, уже в первом слое интерзоны. По-видимому, скачкообразное изменение экспрессии генов связано с действием специфичных для этой зоны сигналов, одним из которых может быть молекулярный кислород (Soupene et al., 1995; раздел IV).

В зоне III выявляются бактериоиды 4-го типа (рис. 2D), которые являются уже полностью дифференцированными и осуществляют фиксацию молекулярного азота (Vasse et al., 1990). По размеру они не отличаются от бактериоидов 3-го типа, однако имеют намного более гетерогенную цитоплазму, в которой видны электронно-плотные и электронно-прозрачные зоны (их число составляет 8-12).

Заключительная стадия развития бактериоидов осуществляется в проксимальной части зоны III. Выявляемые здесь бактериоиды 5-го типа чрезвычайно изменчивы морфологически и характеризуются прогрессивной утратой гетерогенности цитоплазмы. Количество бактериоидов этого типа постепенно уменьшается по мере перехода в зону старения (IV). Продуктами происходящей здесь дегенерации симбиосом являются фрагменты мембран растительного и бактериального происхождения.

III.В. ФИЗИОЛОГИЯ АЗОТФИКСИРУЮЩЕГО БАКТЕРИОИДА

Функционирование клубенька определяется взаимной адаптацией бактериальных и растительных клеток. Последние обеспечивают бактериоидам микроаэрофильные условия, совместимые с активностью нитрогеназы, а также с катаболизмом продуктов фотосинтеза, необходимым для обеспечения азотфиксации энергией. Кроме того, бактериоиды должны эффективно экспортировать в растительные клетки продукты азотфиксации, которые включаются в метаболизм аминокислот. Эти три процесса, которые будут рассмотрены ниже, тесно связаны между собой.

III.В.1. Метаболизм кислорода в бактериоидах

Азотфиксация — весьма энергоемкий процесс: на разрыв тройной связи в одной молекуле азота необходимо израсходовать не менее 16 молекул АТФ. Ризобии, как и другие аэробы, способны получать АТФ в процессе окислительного фосфорилирования, однако возможности для его осуществления в бактериоидах ограничены необходимостью поддержания микроаэрофильных условий, необходимых для работы нитрогеназы. Возникающий таким образом "кислородный парадокс" решается совместно бактериями и растениями. Низкая концентрация кислорода в инфицированных ризобиями растительных клетках (5-30 нМ против 250 мкМ в случае аэробного дыхания) поддерживается за счет наличия в клубеньках диффузионного барьера, а также синтеза растительными клетками леоглобина (Lb) и особенностей дыхания бактериоидов.

Lb — доминирующий белок клубеньков: он составляет до 30% от их общего белкового пула. Имея очень высокое сродство к молекулярному кислороду, Lb характеризуется способностью к быстрой ассоциации и медленной диссоциации с молекулами O₂. Lb появляется в молодых клубеньках

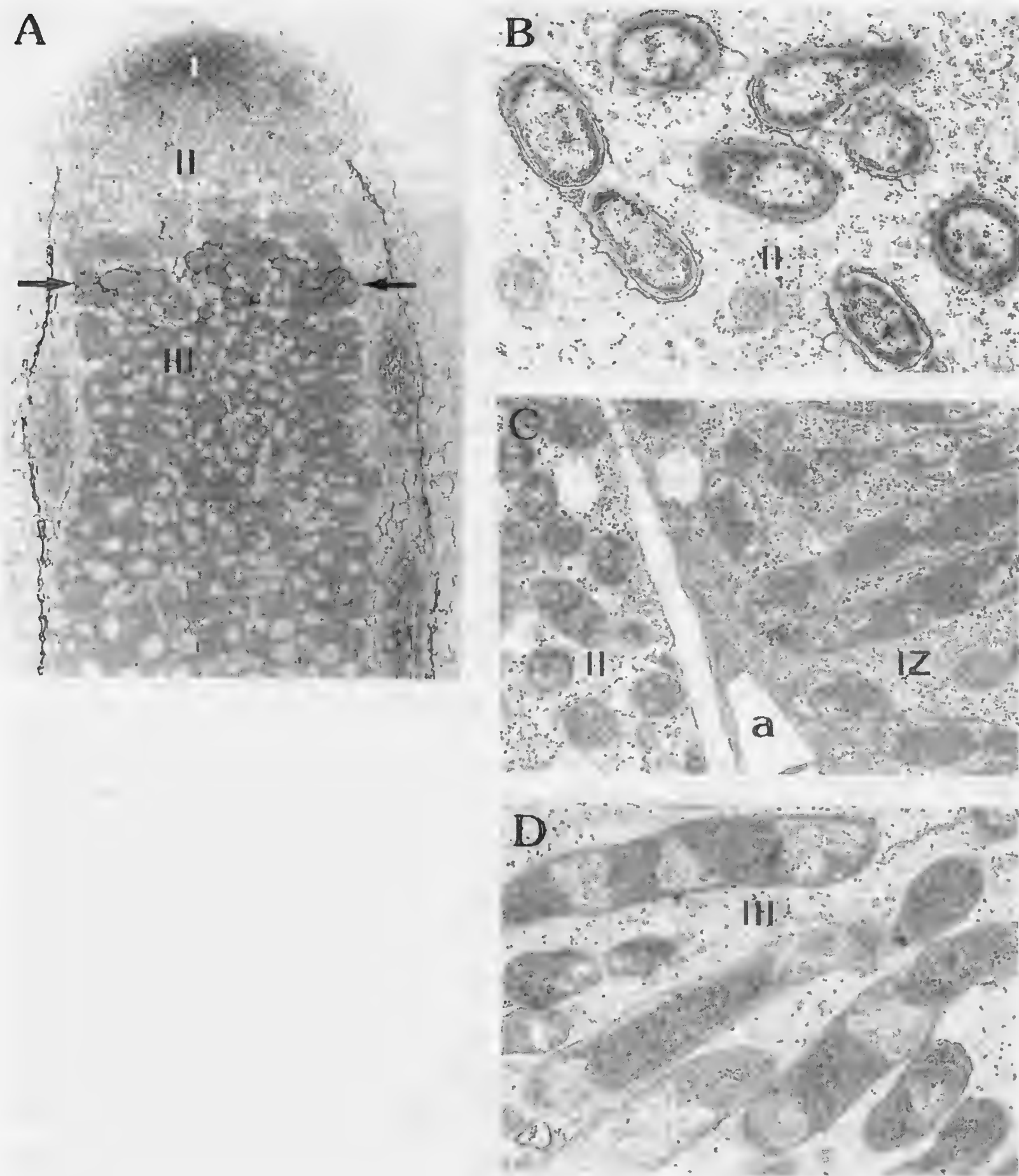


Рисунок 2. Дифференцировка бактериоидов и клубеньков при симбиозе *R. meliloti* с люцерной. А — продольный срез 4-недельного клубенька люцерны: I — меристема, II — зона инфекции, III — зона азотфиксации. Стрелками обозначено расположение интерзоны II-III. В-D — различные стадии развития бактериоидов (увеличение на фотографии В в 2 раза большее, чем на фотографиях С и D; фотографии предоставил G. Truchet). В — бактериоиды I-го типа в дистальной части зоны II. С — бактериоиды II типа в проксимальной части зоны II (слева) и бактериоиды III типа из интерзоны (справа); а — амилопласт. D — бактериоиды IV типа в зоне III.

непосредственно перед началом синтеза нитрогеназы. Функциями Lb являются связывание свободного кислорода и его доставка к активно дышащим бактериоидам (Appleby, 1984).

В бактериоидах медленно растущих клубеньковых бактерий сои (*B. japonicum*) выявлено несколько оксидазных активностей (Bergersen et al., 1976), причем для поддержания азотфиксирующей активности необходима та из оксидаз, которая имеет максимальное сродство к кислороду ($K_m = 5$ нМ). В анаэробно растущих клетках *B. japonicum* выявлены цитохромы aa_3 и o , тогда как в бактериоидах они отсутствуют, но выявляются новые цитохромы — P450, c_{550} , c_{552} и c_{554} (Appleby, 1984).

Важным этапом в изучении симбиотически важных терминальных оксидаз стало выявление генов *fbcFH*, кодирующих цитохромный комплекс bc_1 (Thony-Meyer et al., 1989). Транспозоновые мутанты по этому гену лишены способности к азотфиксации, тогда как мутанты по гену *сусM*, кодирующему субъединицу I цитохрома aa_3 , сохраняют азотфиксирующую активность (O'Brian, Maier, 1987; Bott et al., 1990, 1991). Эти результаты согласуются с данными о наличии разветвленных дыхательных цепей, содержащих комплекс bc_1 . По аналогии с другими известными bc_1 -зависимыми дыхательными цепями можно предположить, что симбиотическая дыхательная цепь содержит цитохром c и его оксидазу. Однако цитохромы P450, c_{550} , c_{552} и c_{554} , кодируемые генами *сусA*, *сусB*, *сусC*, а также цитохром- c -оксидаза, кодируемая генами *сохMNOP*, оказались не нужными для симбиоза, так как мутанты по этим генам сохраняли фенотип Fix^+ (Bott et al., 1992, 1995). Гены, кодирующие оксидазу бактериоидов, были выявлены благодаря их сцеплению с опероном *fixLJ*, характерному для *B. japonicum* и *R. meliloti* (Kahn et al., 1993; Preisig et al., 1993).

Анализ нуклеотидных последовательностей генов *fixNOPQ* позволил подойти к выяснению функций кодируемых ими белков. Оказалось, что белок $FixN$ сходен с субъединицей оксидазы b , содержащей медь, $FixO$ и $FixP$ сходны с моногемовым и дигемовым цитохромами c , соответственно, тогда как $FixQ$ не проявил сходства с известными белками (Preisig et al., 1993). Гомологи генов *fixNOPQ* выявлены у разных видов ризобий, включая *R. leguminosarum* bv. *viciae* и *A. caulinodans* (Schluter et al., 1993; Mandon et al., 1994), а также у *Rhodobacter capsulatus* и *Agrobacterium tumefaciens* (Thony-Meyer et al., 1994b; Schluter et al., 1995).

Мутанты *B. japonicum* по генам *fixN*, *fixO*, *fixP*, но не по гену *fixQ*, имеют сниженные активности TMPD- (триметилфенилендиамин) и цитохром-оксидаз, а также фенотип Fix^- , что согласуется с симбиотическими функциями кодируемых оксидаз бактериоида. Эта оксидаза была выделена из мембранной фракции бактериоидов *B. japonicum*. По причине присутствия цитохромов c и b , а также отсутствия субъединицы II, содержащей центр Cu_A , имеющийся в классических оксидазах, содержащих медь и гем, данная оксидаза была отнесена к типу cbb_3 . У *B. japonicum* она обеспечивает 85% активности цитохром- c -оксидазы бактериоидов. Оксидаза характеризуется величиной $K_m = 7$ нМ для кислорода, что согласуется с данными о концентрации кислорода в клубеньке (Preisig et al., 1996a). У перечисленных бактерий, cbb_3 -оксидазы индуцируются в микроаэробных условиях. Исключение составляет *R. capsulatus*, у которой эта оксидаза может поддерживать аэробный рост.

В отличие от *R. meliloti* и *B. japonicum*, мутанты *A. caulinodans* по генам *fixNOPQ* характеризуются лишь небольшим снижением азотфиксирующей активности как в симбиотическом, так и в свободноживущем состоянии (Mandon et al., 1994). Это различие может быть связано с тем, что *A. caulinodans* имеет расширенный набор оксидаз. Показано, что оксидазы цитохромов b и cbb_3 могут быть использованы в условиях симбиоза, тогда как другие оксидазы, например aa_3 , функционируют в свободноживущих бактериях (Kitts, Ludwig, 1994; Kaminski et al., 1996).

Не исключено, что в контроле симбиотической азотфиксации могут участвовать и другие цитохромы ризобий. Например, у *R. leguminosarum* bv. *trifolii* выявлен цитохром d , синтезируемый при низких концентрациях кислорода, однако в бактериоидах *R. leguminosarum* bv. *viciae* его выявить не удалось (Vargas et al., 1996). В бактериоидах *R. leguminosarum* выявлен o -подобный цитохром. Эти различия в составе цитохромов отражают тот факт, что бактериоиды могут функционировать при различных концентрациях кислорода. Максимальная нитрогеназная активность у бактериоидов *R. leguminosarum* выявлена при 800 нМ кислорода, а у бактериоидов *B. japonicum* — при 100 нМ кислорода. Клетки *A. caulinodans* проявляют максимальную нитрогеназную активность при concentra-

ции растворенного кислорода 10 мкМ, тогда как в корневых и стеблевых клубеньках, образуемых этими бактериями, концентрация кислорода составляет 20 нМ (Gebhardt et al., 1984).

Оперон *fixNOPQ*, локализованный вниз по течению от гена *fixK* у *R. meliloti* и вверх по течению от *fixLJ* у *B. japonicum*, у всех изученных ризобий сцеплен с генами *fixGHIS* (Kahn et al., 1989; Mandon et al., 1993; Preisig et al., 1996b). У *B. japonicum* оба оперона регулируются геном *fixK2* и мутации по обоим оперонам приводят к неспособности фиксировать азот (Fischer, 1994, 1996; Preisig et al., 1996b). Анализ нуклеотидных и выведенных из них аминокислотных последовательностей позволил предположить, что оперон *fixGHIS* кодирует мембранную помпу, переносящую катионы (Kahn et al., 1989). Это предположение основано на том, что: (1) все 4 кодируемых белка содержат потенциальные трансмембранные домены, (2) белок FixG содержит богатые цистеином кластеры, которые характерны для белков, содержащих железо и серу и обычно участвующих в окислительных процессах, (3) белок FixI гомологичен эукариотическим и прокариотическим АТФ-азам Р-типа, которые переносят катионы через мембрану. Возможно, что оперон *fixGHIS* участвует в переносе и метаболизме меди, необходимой для синтеза *cbb₃*-оксидаз (Preisig et al., 1996b). Об этом говорит и гомология (31%) аминокислотных последовательностей белка FixI и белка транспорта меди CopA, выявленного у *Enterococcus hirae*. Кроме того, показано, что активность цитохромоксидазы *cbb₃* зависит от функционирования генов *fixGHIS*. Медь необходима для стабилизации комплекса FixNO перед присоединением к нему белка FixP (Preisig et al., 1996b; Zufferey et al., 1996).

Цитохромы *c*-типа, к которым относятся FixO и FixP, имеют простетическую гемовую группу, и для формирования зрелого холофермента необходимы продукты по меньшей мере 8 генов (Thony-Meyer et al., 1994a; Thony-Meyer, 1997). В связи с важностью дыхания бактериоидов для симбиотической азотфиксации предполагалось, что мутанты с нарушенным созреванием цитохрома *c* будут не способны фиксировать азот. У *B. japonicum* и *R. phaseoli* было выявлено несколько мутантов, лишенных цитохрома *c* (Ramseier et al., 1991; Ritz et al., 1993; Soberon et al., 1993). Нарушенные у них гены *cysHJKL* были выявлены у *B. japonicum*, *R. meliloti* и *R. leguminosarum*. Оказалось, что они действительно необходимы для поддержания симбиотической азотфиксации и, по-видимому, участвуют в присоединении гема к белкам FixO и FixP, а также к цитохрому *c₁* (Delgado et al., 1995; Kereszt et al., 1995; Ritz et al., 1995; Thony-Meyer, 1997).

III.B.2. Углеродный обмен в бактериоидах

Симбиотическая азотфиксация сопровождается потреблением больших количеств углерода, который расходуется на рост клубеньков и размножение бактерий, энергетическое обеспечение азотфиксации, а также на ассимиляцию ее продуктов. В данном разделе мы кратко рассмотрим углеродный обмен в клубеньках, дополнительная информация может быть найдена в главе 24.

Азотфиксирующие бактериоиды используют дикарбоновые кислоты (dcA) как источник углерода. Хотя основным продуктом растительного фотосинтеза является сахароза (Gordon, 1995), она не является источником питания для бактериоидов. Об этом говорит тот факт, что мутанты ризобий, дефектные по усвоению сахаров, как правило, полностью сохраняют азотфиксирующую активность (Day, Copeland, 1991; McDermott, Kahn, 1992). В то же время, мутанты по усвоению дикарбоновых кислот, как правило, лишены способности к симбиотической азотфиксации (Ronson et al., 1981; Finan et al., 1983; Bolton et al., 1986; Watson et al., 1988; Engelke et al., 1989; Yarosh et al., 1989; van Slooten et al., 1992). После попадания в бактериоид dcA катаболизируются в цикле Кребса, так как ризобии являются строгими аэробами.

Некоторые другие C-соединения также могут участвовать в поддержании пролиферации бактерий и дифференцировке бактериоидов по крайней мере у некоторых ризобий. Действительно, мутанты *R. meliloti* и *R. leguminosarum* образуют на своих хозяевах клубеньки, которые не фиксируют азот, но бактериоиды в них полностью дифференцированы (Ronson et al., 1981; Engelke et al., 1989). В то же время, аналогичный мутант штамма *Rhizobium* spp. NGR234 не образует клубеньков на бобовом *Macroptilium* (van Slooten et al., 1992).

Перенос dcA в бактериоиды. Продукты фотосинтеза поступают в клубенек по флоэме в форме сахарозы, которая подвергается ферментации (рис. 3). Она расщепляется под действием сахарозосинтазы, а образующаяся УДФ-глюкоза деградирует до пирувата, который подвергается декарбок-

силированию PEP-карбоксилазой с образованием оксалоацетата. Последний превращается в малат, который и поступает в бактериоиды (Gordon, 1995). Импорт dcA в бактериоиды опосредован двумя активными переносчиками. Один из них имеет растительное происхождение и локализован в перибактероидной мембране (Udvardi et al., 1988; Day et al., 1989). Второй представляет продукт бактериального гена *dctA* — пермеазы, локализованной во внутренней мембране бактериоида (Ronson et al., 1984; Engelke et al., 1989; Jording, Puhler, 1993).

Генетика транспорта dcA в бактериоиды. В свободноживущие клетки *R. leguminosarum* и *R. meliloti* dcA транспортируются посредством индуцибельной системы. Впервые она была изучена у *R. leguminosarum* и оказалась состоящей из двух противоположно ориентированных оперонов, *dctA* и *dctBD* (Ronson et al., 1984; Ronson, 1988). Сходная генетическая система была выявлена и у *R. meliloti* (Engelke et al., 1989; Jiang et al., 1989; Yarosh et al., 1989; Watson, 1990). Гены *dctBD* являются регуляторами и активируют *dctA* — структурный ген пермеазы — при добавлении в среду dcA. Белки DctB и DctD принадлежат к семейству двухкомпонентных регуляторных систем (Nixon et al., 1986; Ronson et al., 1987). При этом DctD является активатором транскрипции гена *dctA*, для чего требуется сигма-54 фактор РНК-полимеразы, кодируемый геном *ntrA* (*rpoN*). Белок DctB является сенсором, который реагирует на присутствие dcA в периплазматическом пространстве. Кроме того, промотор гена *dctA* экспрессируется конститутивно у мутанта по этому гену, что говорит о его авторегуляции, возможно, посредством взаимодействия с мембранным сенсором DctB (Ronson, Astwood, 1985; Yarosh et al., 1989).

У других ризобий генетика транспорта dcA изучена в меньшей степени. Например, штамм NGR234 *Rhizobium* sp. в условиях *ex planta* синтезирует дополнительную пермеазу, которая позволяет *dctA*-мутанту расти на сукцинате (van Slooten et al., 1992). Однако эта пермеаза не работает при симбиозе и поэтому данный мутант не фиксирует азот. У *B. japonicum* также обнаружены две системы транспорта сукцината, одна из которых независима от гена *ntrA* (Humbeck, Werner, 1987; Kullik et al., 1991).

Хотя у *R. leguminosarum* и *R. meliloti* пермеаза DctA функционирует как в чистой культуре, так и при симбиозе, регуляторные гены *dctBD* необходимы только в клубеньках. Нуль-мутанты по гену *dctD*, а также мутанты по *dctB*, оказывающие полярный эффект на *dctD*, оказывают ограниченное действие на экспрессию *dctA*: dcA переносятся в бактериоиды и поддерживают азотфиксацию на уровне 50-70% от исходного штамма (Engelke et al., 1987; Ronson, 1988; Wang et al., 1989; Yarosh et al., 1989). Это говорит о наличии дополнительной системы активации гена *dctA* в бактериоидах, которую назвали ASA (Alternative symbiotic activator). Однако выявить эту систему пока не удалось, хотя для этого пытались найти экстрагенные супрессоры мутаций по гену *dctD*, активные *ex planta*. При этом удалось выявить гомолог гена *dctD* — ген *ntrC*, однако он не является ASA (Labes et al., 1993). На основании анализа промоторов было высказано предположение о том, что ASA соответствует белку NifA (Ronson, 1988). Действительно, инактивация гена *nifA* влияла на экспрессию *dctA* в клубеньках люцерны. Однако экспрессия *dctA* не выявлялась и *ex planta* в условиях, позволяющих работать гену *nifH* (Wang et al., 1989). Таким образом, природа ASA остается загадкой.

Физиологические аспекты действия ASA также неясны. Одна из возможностей состоит в том, что при симбиозе ген *dctA*, по крайней мере, частично, контролируется ASA. В то же время, активация *dctA* может быть результатом компенсаторного эффекта, который проявляется только у мутантов по генам *dctBD*. Разрешить данную дилемму можно только с использованием мутанта по ASA. С этой целью у *R. meliloti* с использованием метода ПЦР был выявлен еще один *ntrA*-зависимый активатор, который является возможным кандидатом на роль ASA (Kaufman, Nixon, 1996).

III.B.3. Азотный обмен в симбиозах

Свободноживущие диазототрофы используют азотфиксацию для роста на безазотных субстратах. Симбиотическая азотфиксация направлена на то, чтобы придать данное свойство растению-хозяину. Ризобии выполняют эту задачу за счет двух особенностей. Во-первых, у всех ризобий, за исключением *A. caulinodans*, синтез нитрогеназы не регулируется азотным статусом клетки. Во-

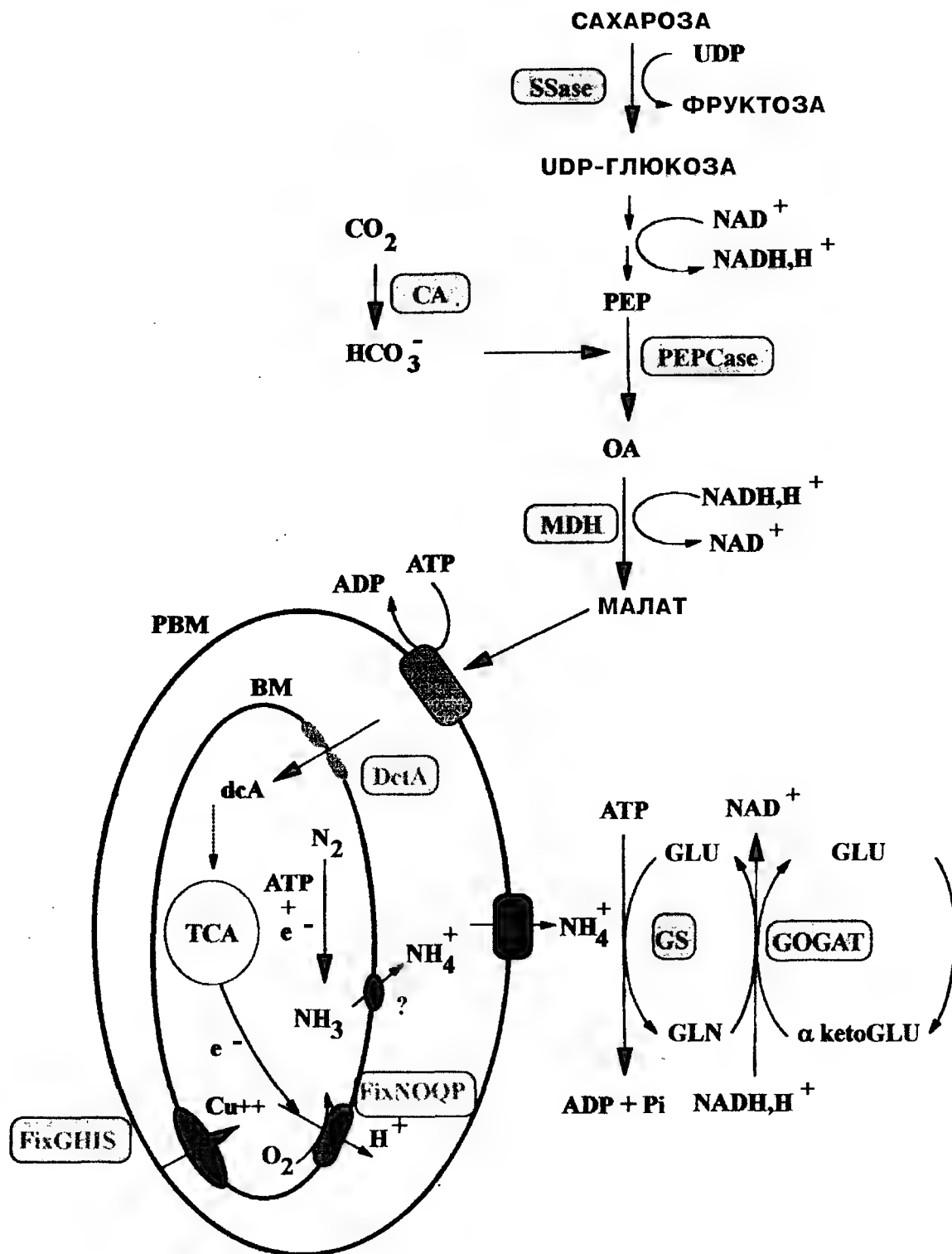


Рисунок 3. Схема обмена метаболитами между азотфиксирующим бактериоидом и растительной клеткой. PBM – перибактероидная мембрана, BM – мембрана бактериоида.

вторых, ризобии сами не усваивают образовавшийся в результате нитрогеназной реакции аммоний, а активно экспортируют его из клеток с использованием специальной помпы (глава 24).

Экспрессия *nif*-генов ризобий не связана с системой *ntrBC*. У ризобий, как и у энтеробактерий, центральную роль в регуляции азотного метаболизма играют гены *ntrBC*. У энтеробактерий эти гены активируют непосредственно ген глутаминсинтетазы (*glnA*), обеспечивающий ассимиляцию аммония в условиях азотного дефицита. Гомологи генов *ntrBC* были выявлены у *R. meliloti*, однако они оказались не связанными с контролем экспрессии *nif*-генов, а мутанты по генам *ntrBC* полностью сохраняли способность к симбиотической азотфиксации (Szeto et al., 1987). Кроме того, гены *ntrBC* оказались не нужными для экспрессии регуляторного пути *fixK/fixNOPQ* (David et al., 1988). Вместо этого экспрессия *nif*- и *fix*-генов *R. meliloti* оказалась зависимой от концентрации кислорода (Ditta et al., 1987; David et al., 1988; раздел IV). Поэтому первичным сигналом, запускающим экспрессию *nif/fix* генов *R. meliloti* в клубеньках, является низкая концентрация кислорода. Этот сигнал действует посредством оперона *fixLJ*, который в регуляторной системе ризобий занимает место оперона *ntrBC*.

Зависимость азотфиксации от кислорода и ее независимость от азота была показана также для *B. japonicum*, хотя система регуляции у этих бактерий не такая как у *R. meliloti* (раздел IV).

Принципиально иная регуляция азотфиксации характерна для *A. caulinodans*: экспрессия *nif*-генов в зависимости от кислорода контролируется системой *fixLJ*, а в зависимости от азота — двумя сходными двухкомпонентными системами — *ntrBC* и *ntrXY* (раздел IV). Необходимость азотного контроля экспрессии *nif*-генов *ex planta* понятна, однако наличие такого контроля в клубеньках требует разъяснений. Пока не вызывает сомнений лишь то, что наличие нескольких систем контроля связано с тем, что *A. caulinodans* — это единственная известная форма ризобий, которая способна не только к симбиотической азотфиксации, но и к диазотрофному росту в чистой культуре.

Ассимиляция аммония подавлена в бактериоидах. В то время как *A. caulinodans*, как и энтеробактерии, имеет единственную глутаминсинтетазу (Donald, Ludwig, 1984), виды *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* обладают, по меньшей мере, двумя различными глутаминсинтетазами. GSI является гомологом фермента энтеробактерий и кодируется геном *glnA* (Somerville, Kahn, 1983; Carlson et al., 1985; Colonna et al., 1987; Moreno et al., 1991). Регуляция этого гена у ризобий до сих пор не изучена, известно лишь, что его экспрессия незначительно зависит от наличия азота (Carlson et al., 1987; Arcondeguy et al., 1996). Второй фермент, GSII кодируется геном *glnII*, который сходен с генами эукариотических глутаминсинтетаз и находится под контролем системы *ntrBC* (Carlson, Chelm, 1986; de Bruijn et al., 1989). Кроме того, у *R. meliloti* и *R. etli* описан третий фермент, GSIII (de Bruijn et al., 1989; Espin et al., 1990; Chiurazzi et al., 1992; Shatters et al., 1993). Однако, его физиология неясна, он выявляется только у двойных мутантов *glnAglnII* и имеет низкую биосинтетическую активность (Shatters et al., 1993). Показано, что GSI, GSIII, а возможно и GSII регулируются на посттрансляционном уровне (Ludwig, 1978; Rossi et al., 1989; Manco et al., 1992; Liu, Kahn, 1995; Arcondeguy et al., 1996).

При дифференцировке бактериоидов их метаболизм переключается с усвоения аммония на его экспорт. Поэтому в бактериоидах наблюдается очень низкая активность глутаминсинтетаз, и отсутствует аденилирование GSI (Arcondeguy et al., 1996). Наличие GSII в бактериоидах *R. meliloti* или *R. etli* не может быть выявлено с использованием генного слияния *glnII-lacZ* или же антител против белка GSII (de Bruijn et al., 1989; Shatters, Kahn, 1989; Moreno et al., 1991). Важно отметить, что в бактериоидах *R. etli* резко снижена и активность *ntrBC*, причем репрессия происходит до включения генов азотфиксации (Patriarca et al., 1996).

В то же время, глутаминсинтетазы ризобий могут играть определенную роль в симбиозе. Действительно, двойной мутант *glnAglnII B. japonicum* характеризуется резко сниженной инфекционностью и азотфиксирующей активностью (Carlson et al., 1987). Мутант *R. etli* по гену *glnA* имеет на 50% сниженную азотфиксирующую активность (Moreno et al., 1991). Дефектный по глутаминсинтетазе мутант *A. caulinodans* вообще не способен фиксировать азот (Donald, Ludwig, 1984). В то же время, двойной мутант *glnAglnII R. meliloti* образует на люцерне азотфиксирующие клубеньки (de Bruijn et al., 1989), возможно, благодаря наличию гена *glnT* (Shatters et al., 1993). По-видимому,

низкий уровень ассимиляции аммония необходим для нормального прохождения инфекционного процесса, а возможно и для дифференцировки бактериоидов.

Бактериоиды экскретируют аммоний, который ассимилируется растительными клетками. Предположение о том, что фиксированный азот передается в растительные клетки в форме аммония, возникло уже достаточно давно (Bergersen, Turner, 1967). Действительно, изолированные бактериоиды, усваивающие ^{14}C -сукцинат, не выделяли в среду ^{14}C -меченых соединений (Miller et al., 1991). Кроме того, в растительных клетках, содержащих симбиосомы, резко возрастает активность глутаминсинтетаз, и даже синтезируются специфические новые формы этого фермента (Cullimore, Bennett, 1992), что показывает активное усвоение аммония.

В перибактероидных мембранах сои удалось выявить каналы для переноса аммония, которые, возможно, используются при его экспорте в растительную цитоплазму (Tuerkman et al., 1995). Однако в мембранах бактериоидов каких-либо транспортных компонентов пока выявлено не было. Не исключено, что аммиак выходит из бактериоидов путем простой диффузии, после чего превращается в аммоний в перибактероидном пространстве.

III.C. ГЕНЕТИКА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ БАКТЕРИОИДОВ

В процессе дифференцировки в бактериоиды клетки ризобий подвергаются значительным структурным и регуляторным изменениям. Связь многих из этих изменений с азотфиксацией остается неясной. Однако изучение их генетического контроля представляет большой интерес для понимания роли физиологических условий, складывающихся внутри клубенька, в координированной дифференцировке бактериальных и растительных клеток.

III.C.1. Репликация ДНК и клеточные деления

Вскоре после перехода в растительные клетки в бактериях останавливаются клеточные деления и репликация ДНК. У *Escherichia coli* одной из наиболее ранних стадий деления клетки является формирование кольца из белка FtsZ. У *R. meliloti* были выявлены два существенно различающихся гомолога этого гена (Margolin et al., 1991; Margolin, Long, 1994). Позднее был клонирован ген *dnaA* *R. meliloti*, который, по аналогии с *E. coli*, может считаться кандидатом на роль регулятора клеточных делений (Margolin et al., 1995).

III.C.2. Репрессия генов клубенькообразования

После выхода клеток *R. leguminosarum* bv. *viciae* из инфекционных нитей наблюдается прекращение транскрипции *nod*-генов (Schlaman et al., 1991). Это может быть важным для функционирования клубеньков, поскольку конститутивная экспрессия *nod*-генов *in planta* приводит к отсутствию азотфиксации (Knight et al., 1986). Оказалось, что репрессия *nod*-генов не связана с отсутствием белка NodD или флавоноидов, что говорит в пользу действия *in planta* неизвестного механизма негативной регуляции (Schlaman et al., 1991, 1992). Кроме того, репрессия *nod*-генов может быть связана с изменениями углеродного обмена. Так, мутант *R. leguminosarum* bv. *viciae*, несущий вставку IS50 в гене *dctB* (один из элементов регуляции транспорта в бактериоиды дикарбоновых кислот), способен к конститутивному транспорту *dcA* в бактериоиды и проявляет ограниченную экспрессию генов *nodC* и *nodD* в клубеньках (Mavridou et al., 1995). Показано, что органические кислоты подавляют экспрессию *nod*-генов у *B. japonicum* (Yuen, Stacey, 1996). Поэтому подавление активности *nod*-генов в клубеньках может быть по крайней мере частично связано с интенсивным транспортом дикарбоновых кислот в бактериоиды.

III.C.3. Репрессия гена *ropA*

Белки наружной мембраны свободноживущих клеток *R. leguminosarum* bv. *viciae* разделяются на 4 основные антигенные группы, 2 из которых практически отсутствуют в бактериоидах (de Maagd et al., 1989, 1994; глава 3). Удалось выявить ген *ropA*, который кодирует один из белков антигенной группы III (de Maagd et al., 1992), а также ген *ropB*, кодирующий белок группы II (Roest et al., 1995b). Опыты по гибридизации *in situ* показали, что транскрипция *ropA* подавляется в зонах II и II-III клубенька (de Maagd et al., 1994). Это подавление происходит после репрессии *nod*-генов и

одновременно с индукцией *nif*- и *fix*-генов, однако не связано с экспрессией последних или с фиксацией азота (Roest et al., 1995a). В условиях *ex planta* экспрессия гена *ropA* подавляется ионами кальция (de Maagd et al., 1994), однако их роль в регуляции *ropA* в клубеньках неясна.

III.C.4. *BacA* — возможный регулятор развития бактериоидов

Поскольку дифференцировка бактериоидов необходима для азотфиксации, можно предполагать, что среди мутантов ризобий, имеющих фенотип Fix⁻, будут выявлены и мутанты, дефектные по формированию бактериоидов. Однако фенотип Fix⁻ обычно сопровождается столь быстрой деградацией бактерий внутри клеток, что проследить влияние мутаций на образование бактериоидов часто оказывается очень сложным. Однако у *R. meliloti* удалось получить несколько мутантов по *nif*- и *fix*-генам, которые могли дифференцироваться в бактериоиды 4 и 5 типов, что создало возможность генетического разделения дифференцировки бактериоидов и азотфиксации (Hirsch et al., 1983; Hirsch, Smith, 1987). Мутанты *R. meliloti* по генам *fixLJ* образуют бактериоиды 2-го типа, то есть эти гены определяют ранние этапы формирования бактериоидов (Vasse et al., 1990; раздел IV). Тем не менее, индукция дифференцировки бактериоидов, по-видимому, не связана с генами *fixLJ*. У *B. japonicum* резкое нарушение образования и стабильности бактериоидов выявлено у мутантов по гену *nifA* (Fischer et al., 1986).

Наилучшим кандидатом на роль истинного регулятора развития бактериоидов является ген *bacA* *R. meliloti* (Glazebrook et al., 1993). Мутации по этому гену блокируют самые ранние стадии образования бактериоидов. Клетки мутанта по гену *bacA* претерпевают нормальный эндоцитоз, однако затем деградируют столь быстро, что бактериоиды 2-го и даже 1-го типов не могут быть выявлены. Кроме того, максимальная экспрессия *bacA* наблюдается в тех участках клубенька, где начинается образование бактериоидов (проксимальная часть зоны II, интерзона II-III и дистальная часть зоны III). Анализ нуклеотидной последовательности показал, что: (1) *bacA* гомологичен гену *sbmA* *E. coli*, который, по косвенным данным, участвует в транспорте пептидов; (2) белковый продукт этого гена может быть мембранным белком. Возможно, что белок *BacA* обеспечивает транспорт в бактерии сигнального фактора белковой природы, который и индуцирует дифференцировку бактериоидов (Glazebrook et al., 1993; Yorgey, Kolter, 1993).

IV. Регуляция генов азотфиксации

Азотфиксирующие клубеньки — органы смешанного происхождения, морфогенез и дифференцировка которых являются результатом диалога между растением его бактериальными симбионтами. Экспрессия генов азотфиксации свидетельствует об успешности этого диалога, в котором используются как метаболические, так и регуляторные сигналы. Тот факт, что бактериальный партнер является факультативным симбионтом, который может культивироваться вне растения, открывает дополнительные возможности для изучения регуляции симбиоза.

В последние годы достигнут значительный прогресс в изучении регуляции генов симбиотической азотфиксации (Fischer, 1994). Как уже отмечалось, у одних ризобий (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*) гены азотфиксации активны только при симбиозе, тогда как у других ризобий (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*) — также и в чистой культуре. В последнем случае (*B. japonicum*) фактором, лимитирующим экспрессию *nif*-генов, является молекулярный кислород (Bergersen et al., 1976). Получены данные о том, что при взаимодействии *R. meliloti* с люцерной активация этих генов происходит с участием специальных сигналов, поступающих от хозяина (Gussin et al., 1986). В то же время, экспрессия некоторых *nif*-генов у этих бактерий может наблюдаться и в чистой культуре при отсутствии кислорода (Ditta et al., 1987).

В этой главе мы рассмотрим пути регуляции генов симбиотической азотфиксации. Наиболее интересным свойством этих путей является то, что у разных видов ризобий они состоят из сходных элементов, действующих в различных комбинациях. Обнаружение регуляторных генов во многом облегчалось тем, что многие из них локализованы вблизи регулируемых ими структурных *nif*- и *fix*-генов.

IV.A. КОМПОНЕНТЫ ПУТЕЙ РЕГУЛЯЦИИ

IV.A.1. Транскрипционный активатор *NifA*

Впервые ген *nifA*, необходимый для транскрипции структурных генов нитрогеназы (*nifHDK*), был обнаружен у *R. meliloti* как элемент кластера генов, гомологичных *nif*-генам *K. pneumoniae* (Zimmerman et al., 1983; Szeto et al., 1984). Белок NifA *R. meliloti* оказался гомологичным белкам NifA и NtrC *K. pneumoniae*, из которых второй активирует гены азотного метаболизма при голодании по аммонии (Drummond et al., 1986). Высокая гомология белков NifA у разных видов ризобий позволяет построить обобщенную схему их организации (рис. 4).

Белки NifA и NtrC активируют транскрипцию структурных генов нитрогеназы вместе с сигма-54 субъединицей РНК-полимеразы, которая узнает консервативную последовательность в положении -12/-24 (Kustu et al., 1989). Активация белка NtrC происходит за счет гидролиза молекулы АТФ, связанной с центральным доменом NtrC, в результате чего закрытый комплекс РНК-полимеразы с ДНК преобразуется в открытый комплекс (Weiss et al., 1991; Austin, Dixon, 1992). Гомологичный нуклеотид-связывающий мотив присутствует и в белке NifA, и для образования открытого комплекса необходимо взаимодействие этого белка с АТФ или с другим нуклеотид-трифосфатом (Berger et al., 1994). С-терминальный домен NifA также гомологичен NtrC и содержит мотив "спираль-поворот-спираль", ответственный за связывание с регуляторной последовательностью, лежащей в 100 п.н. выше сайта начала транскрипции. В отличие от NtrC, белок NifA не содержит N-терминального ресиверного домена и поэтому не может считаться частью двухкомпонентной регуляторной системы (раздел IV.A.3.). Особенностью белка NifA ризобий является чувствительность к кислороду, которая была показана путем активации гена *nifH* в клетках *E. coli*, выращенных при различных режимах аэрации (Fischer, Hennecke, 1987; Beynon et al., 1988; Klipp et al., 1989). Чувствительность NifA к кислороду определяется цистеиновыми остатками, которые могут быть частью мотива, связывающего железо и расположенного между центральным и ДНК-связывающим доменами (Fischer et al., 1988). У *K. pneumoniae* не имеющей железо-связывающего мотива в белке NifA, его инактивация кислородом осуществляется в аэробных условиях при взаимодействии с негативным регулятором NifL (Berger et al., 1994; Hill et al., 1996).

Роль связанного металла в активности белка NifA показана путем анализа действия хелатирующих агентов на индукцию NifA-зависимой транскрипции (Fischer et al., 1988). Выявление мутантных аллелей NifA, активирующих ген *nifH* в присутствии кислорода, позволяет подойти к изуче-

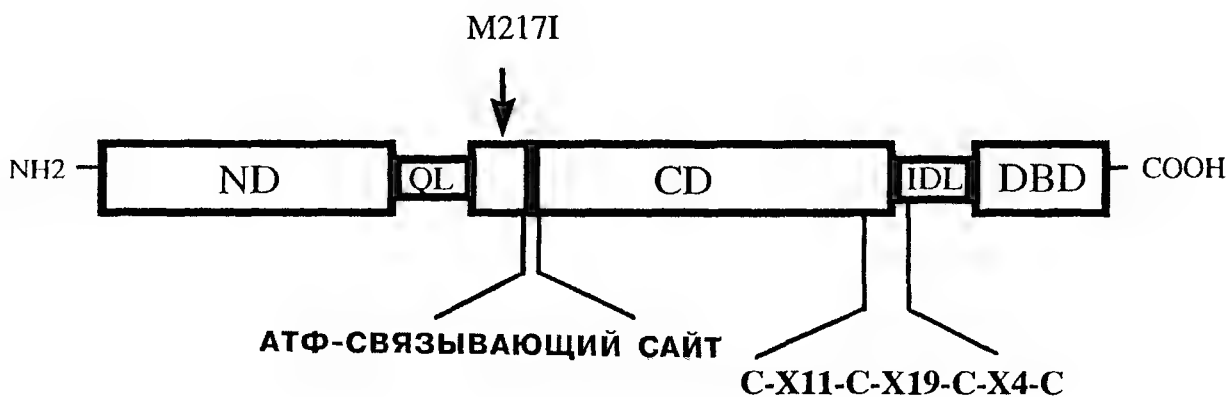


Рисунок 4. Белок NifA *R. meliloti*. ND — аминотерминальный домен, CD — центральный домен, DBD — ДНК-связывающий домен, QL — линкер Q, IDL — междоменный линкер, характерный для кислород-чувствительных белков NifA.

нию механизмов кислородной репрессии функций NifA (Krey et al., 1992). Все изученные мутанты имели замещение остатка метионина на изолейцин в непосредственной близости от АТФ-связывающего сайта (рис. 4). По-видимому, изменение степени окисления железа, связанного с цистеин-богатым мотивом, меняет конформацию NifA вблизи АТФ-связывающего сайта. Замена метионина на изолейцин приводит к тому, что АТФ-связывающий сайт сохраняет активную конфигурацию вне зависимости от степени окисления железа. Альтернативная гипотеза предполагает, что мутация повышает стабильность белка в присутствии кислорода. Опыты *in vivo* показали, что кислород может модифицировать как активность, так и стабильность белка NifA. Выяснилось, что в этих условиях белок NifA теряет способность защищать регуляторную последовательность промотора *nifH* после кратковременного воздействия кислорода на клетки *B. japonicum*. При более длительном воздействии кислорода наблюдается дегградация NifA (Morett et al., 1991).

Все белки NifA, выявленные у ризобий, очень сходны в отношении структуры центрального и С-терминального доменов, которые участвуют в активации белка и его связывании с ДНК. В то же время, структура N-терминального домена очень изменчива, а у *R. leguminosarum* bv. *trifolii* он вообще отсутствует (Iismaa, Watson, 1989). Возможно, что этот домен выполняет какие-то регуляторные функции (Huala, Ausubel, 1989). Ген *fixR*, который у *B. japonicum* транскрибируется совместно с *nifA*, не является существенным для фиксации азота (Thony et al., 1987). Сходство его продукта с белком NodG и с другими дегидрогеназами показывает, что FixR может регулировать NifA в зависимости от окислительного статуса.

IV.A.2. Альтернативный фактор сигма-54

Этот фактор представляет собой субъединицу РНК-полимеразы, которая кодируется геном *ntrA* (*rpoN*) и была выявлена благодаря наличию консервативных цис-регуляторных последовательностей в положении -12/-24 гена *dctA*, кодирующего пермеазу дикарбоновых кислот (Ronson et al., 1987). Оказалось, что мутанты по гену *ntrA* утрачивают способность к активации как *dctA*, так и структурных генов нитрогеназы.

Гомологи гена *ntrA* выявлены у *B. japonicum*, *A. caulinodans*, а также у штамма NGR234 *Rhizobium* sp. (van Slooten et al., 1990; Kullik et al., 1991; Stigter et al., 1993). При этом у *B. japonicum* выявлены две по-разному регулируемые копии *ntrA*. Несколько копий этого гена обнаружено и у *A. caulinodans* (Loroch et al., 1995).

IV.A.3. Двухкомпонентная регуляторная система FixL/J

Впервые гены *fixLJ* были выявлены в составе *fix*-кластера *R. meliloti* (David et al., 1987; Renalier et al., 1987). Регуляторная система FixLJ оказалась необходимой для экспрессии многих *nif*(*fix*)-генов и в частности, регуляторного гена *nifA* (David et al., 1988). Белки FixL и FixJ входят в семейство двухкомпонентных регуляторных систем, которые позволяют клеткам отвечать на действие факторов внешней среды посредством переноса фосфатной группы с сенсорной киназы на регулятор, который обычно является активатором транскрипции (Nixon et al., 1986; Albright et al., 1989; Parkinson, Kofoed, 1992). При этом белок FixL является сенсором, а FixJ — активатором транскрипции регулируемых генов. Поскольку контролируемые ими гены экспрессируются в микроаэрофильных условиях, предполагается, что FixL выполняет роль детектора концентрации кислорода (David et al., 1988). Тот факт, что белок FixL является гемопротеином, подтверждает эту гипотезу (Gilles-Gonzalez et al., 1991). FixL состоит из 505 аминокислотных остатков, образующих три домена, среди которых лишь один является консервативным для разных сенсорных белков. Этот домен расположен на С-конце белка и содержит АТФ-связывающий сайт, в котором происходит автофосфорилирование, возможно, по гистидиновому остатку (Monson et al., 1992). Центральный вариабильный домен FixL является цитоплазматическим и образует нековалентную связь с гемом, который может отвечать за модификацию каталитических свойств белка в присутствии кислорода (de Philip et al., 1992; Monson et al., 1992, 1995). FixL — первый пример гемопротеина, являющегося сенсором кислорода. Амино-терминальная гидрофобная часть этого белка, возможно, определяет его прикрепление к мембране (Lois et al., 1993). При утрате этой части FixL сохра-

няет способность реагировать на кислород как *in vivo*, так и *in vitro* (Gilles-Gonzalez et al., 1991; de Philip et al., 1992).

Способность белка FixJ, состоящего из 204 аминокислотных остатков, активировать транскрипцию была показана с использованием гетерологичной системы (*E. coli*), а также в опытах *in vitro* (Hertig et al., 1989; de Philip et al., 1990). Амино-терминальный домен белка гомологичен ресиверному домену других членов семейства, включая NtrC, VirG, а также белок CheY, состоящий только из ресиверного домена (David et al., 1988; Kahn, Ditta, 1991; Parkinson, Kofoed, 1992). В этих белках консервативный остаток аспартата, расположенный в белке FixJ в позиции 54, фосфорилируется в присутствии соответствующего автофосфорилированного сенсорного белка (Parkinson, Kofoed, 1992; Sanders et al., 1992). Как и многие другие регуляторные белки, FixJ может быть фосфорилирован в присутствии активных доноров фосфата, например, ацетил-фосфата (Lukat et al., 1992; Reyrat et al., 1993).

Сигнальную систему, состоящую из белков FixL и FixJ, удалось полностью реконструировать *in vitro* (Agron et al., 1993; Reyrat et al., 1993) и предложить модель ее действия. Предполагается, что в бескислородных условиях FixL автофосфорилируется (Gillez-Gonzalez, Gonzalez, 1993; Lois et al., 1993), после чего происходит фосфорилирование FixJ за счет использования FixL-фосфата в качестве донора в реакции, не зависящей от кислорода (Lois et al., 1993). В результате транскрипционная активность FixJ возрастает не менее чем в 100 раз (Reyrat et al., 1993). Кроме того, FixL обладает фосфатазной активностью, которая может снижаться при отсутствии кислорода (Lois et al., 1993; Monson et al., 1995). Поэтому опосредованная FixL кислородная регуляция транскрипционной активности FixJ определяется антагонистическими эффектами кислорода на киназную и фосфатазную активности белка FixL. Фосфорилирование белка FixJ позволяет ему связываться с регуляторными последовательностями гена *fixK*, регулируемого *fixJ* (Galinier et al., 1994). В этом участвует сайт с высоким сходством (положение -69/-44 относительно точки начала транскрипции) и сайт с низким сходством (участок -57/-31, включающий промотор в положении -35). С-терминальный домен белка FixJ может связываться с этими последовательностями и активировать транскрипцию, а значит N-терминальный фосфорилируемый домен играет роль регулятора (Da Re et al., 1994; Galinier et al., 1994). Анализ аминокислотных последовательностей показал, что С-терминальный домен белка FixJ гомологичен району 4 сигма-факторов, который участвует в узнавании -35 района промоторов (Kahn, Ditta, 1991). Однако для связывания коровой части РНК-полимеразы *E. coli* с промоторами генов *fixK* и *nifA* необходима также и сигма-70 субъединица (Batut et al., 1991; Reyrat et al., 1993; Da Re et al., 1994).

Путем гибридизации и анализа нуклеотидных последовательностей локусов, содержащих *fix*-гены, гомологи *fixL* и(или) *fixJ* были выявлены у *B. japonicum*, *R. leguminosarum* (bv. *viciae*, bv. *phaseoli*) и у *A. caulinodans* (Anthamatten, Hennecke, 1991; Kaminski, Elmerich, 1991; D'hooghe et al., 1995; Patschkowski et al., 1996). Все гомологи белка FixL имеют С-терминальный консервативный домен (приблизительно 250 аминокислотных остатков). Кроме того, в них имеется консервативный центральный домен (около 115 остатков), являющийся сенсором кислорода. Присутствие этого домена было подтверждено в открытой рамке считывания, выявленной у *A. caulinodans* в необычном окружении (Kahn, 1993). У *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* центральный домен белка FixL, хотя и гомологичен соответствующим доменам других ризобий, не содержит гистидинового остатка в положении 194 и ряда других смежных консервативных остатков, которые участвуют в связывании гема (D'hooghe et al., 1995).

N-терминальный домен белка FixL является наименее консервативным. Этот гидрофобный домен, определяющий прикрепление белка к мембране, выявлен у *A. caulinodans* и *R. meliloti*, но отсутствует у *B. japonicum*. Возможно, что связанные с N-терминальным доменом различия в точной локализации FixL у разных видов ризобий определяют разные механизмы узнавания кислорода, или что этот белок у *A. caulinodans* и *R. meliloti* может служить сенсором еще каких-то сигналов. Данные вопросы могут быть решены с использованием химерных белков или путем анализа сигнальных процессов в гетерологичных системах. Белок FixL *R. leguminosarum* bv. *viciae* содержит дополнительный С-терминальный домен, гомологичный ресиверному домену регуляторов двух-

компонентных систем. В связи с этим интересно отметить, что данный вид, в отличие от других ризобий, не имеет кластера *FixLJ*.

Гомологи гена *fixJ* выявлены у всех видов ризобий за исключением *R. leguminosarum* bv. *viciae*. N-терминальный домен его белкового продукта гомологичен фосфорилируемому ресиверному домену регуляторов двухкомпонентных систем. Кроме того, белок FixJ содержит мотив “спираль-поворот-спираль”, ответственный за связывание с ДНК. Консервативность этого мотива соответствует консервативности промоторной последовательности, выявляемой в –35 положении всех FixJ-активируемых генов (Waelkens et al., 1992).

IV.A.4. *FixK* – фактор, гомологичный *Fnr*

Белок FixK, состоящий из 211 аминокислотных остатков, был выявлен после секвенирования *fix*-локуса *R. meliloti*, содержащего также гены *fixLJ*. Анализ предполагаемой аминокислотной последовательности показал, что данный белок принадлежит к семейству Fnr-Csr (Shaw et al., 1983; Batut et al., 1989). У *R. meliloti* выявлены две функционально активные копии гена *fixK* с очень сходными последовательностями (Renalier et al., 1987). FixK функционирует как позитивный регулятор оперона *fixNOPQ*, который кодирует компоненты специфичной для бактериоидов дыхательной цепи (раздел III). При этом FixK негативно регулирует собственный структурный ген, а также ген *nifA*. С-терминальный домен FixK содержит ДНК-связывающий мотив “спираль-поворот-спираль”, который может реагировать с Fnr-зависимыми промоторами (Cherfils et al., 1989). Очищенный белок FixK реагировал с последовательностью, находящейся перед геном *fixN* (Foussard et al., 1997). Сходная последовательность, расположенная в 480 п.н. перед сайтом транскрипции гена *fixK*, связывается с белком FixK и может обуславливать его негативную авторегуляцию (Waelkens et al., 1992; Foussard et al., 1997). Несмотря на общее сходство аминокислотных последовательностей, белок FixK лишен в своей N-терминальной части цистеиновых остатков, которые имеются в белке Fnr и обуславливают его взаимодействие с кислородом. В соответствии с этим, анализ кислород-независимых мутантов по гену *fixJ* показал, что белок FixK не чувствителен к кислороду (Soupepe et al., 1995).

Гомологи гена *fixK* выявлены у различных видов ризобий с использованием трех методов: 1) гибридизация с геном *fixK* *R. meliloti*, позволившая выявить гомолог этого гена у *B. japonicum* (Anthamatten et al., 1992); 2) гетерологичная комплементация мутанта *R. meliloti*, дефектного по активности FixK, что позволило вывить гомолог этого белка у *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Colonna et al., 1990; Schluter et al., 1992); 3) секвенирование *fix*-кластеров, позволившее выявить гомолог *fixK* у *A. caulinodans*, а также дополнительные копии этого гена у *R. leguminosarum* bv. *viciae* и *B. japonicum* (Kaminski et al., 1991; Fischer, 1994; Patschkowski et al., 1996).

Все гомологи белка FixK имеют два консервативных элемента: 1) центральный домен из 6 глициновых остатков, который может быть связан с формированием бета-структуры, 2) мотив “спираль-поворот-спираль” на С-конце, сходный с ДНК-связывающими доменами белков Fnr и Csr. Чувствительность белка Fnr к кислороду может быть обусловлена коферментом, содержащим железо и серу и связанным с остатками цистеина. Такие остатки найдены в N-терминальной части белка FnrN *R. leguminosarum* bv. *viciae*, а также FixK1 *B. japonicum* (оба белка чувствительны к кислороду). В то же время, данные цистеиновые остатки не обнаружены в белках FixK *R. meliloti*, FixK *A. caulinodans* и FixK2 *B. japonicum*. Вероятно, что два последние белка не чувствительны к кислороду, как это было показано для FixK *R. meliloti*.

IV.A.5. *NtrB/C* – сенсорная система, регулирующая азотный статус

Белки NtrB и NtrC составляют двухкомпонентную регуляторную систему, которая вместе с белком P_{II} обеспечивает адаптацию азотного метаболизма *E. coli* и *K. pneumoniae* к наличию различных источников азота (Reitzer, Magasanik, 1987). Так, у *K. pneumoniae* система NtrB/C регулирует экспрессию гена *nifA* в зависимости от азотного статуса (Gussin et al., 1986). Гомологи этих белков найдены у ризобий и играют роль в регуляции азотного обмена свободноживущих бактерий (Szeto et al., 1987). У *A. caulinodans* выявлена дополнительная система NtrY/X, гомологичная NtrB/C, причем NtrY – это трансмембранный сенсор. Эти две системы участвуют в регуляции не только азотного обмена *ex planta*, но и симбиотической азотфиксации у *A. caulinodans* (Pawlowski et al., 1991).

IV.A.6. *NrfA*: новая функция старого гена

Регуляторный ген *nrfA* выявлен у *A. caulinodans* после ЭМС-мутагенеза и отбора мутантов, дефектных по синтезу набора белков, обычно выявляемых при азотфиксации (Denefle et al., 1987). Мутации по гену *nrfA* нарушают экспрессию *nifA* и, соответственно, *nifA*-регулируемых генов (Kaminski et al., 1994). Белок NrfA гомологичен фактору HF-I *E. coli*, который является РНК-связывающим белком, необходимым для репликации РНК-содержащего фага Qb. Показано, что фактор HF-I важен для трансляции гена *rpoS* *E. coli* (Muffler et al., 1996). Поэтому можно предположить, что и белок *nrfA* участвует в регуляции трансляции *nifA*.

IV.B. Сравнение путей регуляции *nif*- и *fix*-генов

Сравнение путей регуляции *nif*- и *fix*-генов *R. meliloti*, *B. japonicum* и *A. caulinodans* (рис. 5) показало, что они состоят из одинаковых элементов, действующих в разных сочетаниях. Одно из основных различий состоит в том, что транскрипция *nifA* у *R. meliloti* и *A. caulinodans* находится под контролем системы FixL/J, обеспечивающей первый уровень кислородного контроля экспрессии *nif*-генов. В то же время, у *B. japonicum* кислородный контроль экспрессии гена *nifA* осуществляется главным образом посредством авторегуляции. В микроаэрофильных условиях транскрипция гена *nifA* обеспечивается собственным белковым продуктом, взаимодействующим с сигма-54-зависимым промотором. В аэробных условиях, когда белок NifA находится в неактивном состоянии, низкий уровень экспрессии гена *nifA* определяется альтернативным промотором (Bartios et al., 1995). Хотя у *B. japonicum* система FixL/J не участвует в регуляции *nifA*, она может контролировать активность генов нитрогеназы, изменяя количество альтернативного сигма-фактора NtrC, необходимого для транскрипции *nifH*-генов (Kullik et al., 1991). Это достигается посредством активации системой FixL/J одной или двух копий гена *rpoN* (*ntrA*).

У *R. leguminosarum* bv. *viciae* до сих пор не выявлен гомолог белка FixJ, а ген *nifA* экспрессируется независимо от *fixL* и *fixK* (Patschkowski et al., 1996). У *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* экспрессия гена *nifA* происходит независимо от FixL/J (D'hooghe et al., 1995). Примером комбинации регуляторных элементов данной системы является и тот факт, что белок FixK является репрессором гена *nifA* у *R. meliloti*, но активатором *nifA* у *A. caulinodans* (Batut et al., 1989; Kaminski et al.,

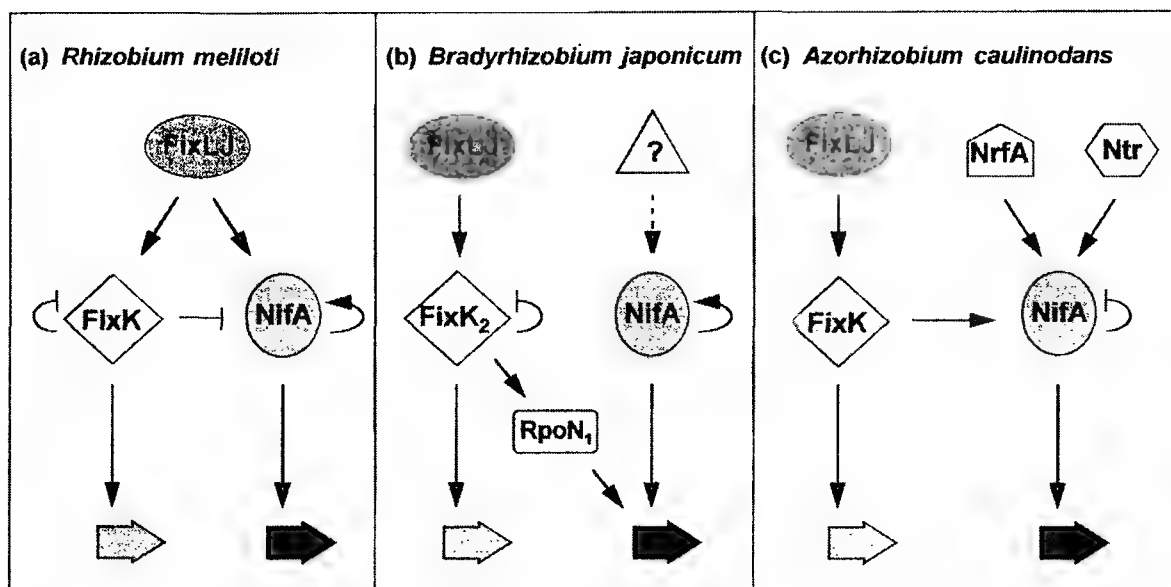


Рисунок 5. Регуляция *nif*-генов у разных видов ризобий (Fischer, 1996).

1991; Loroach et al., 1995). В дополнение к наиболее подробно изученной кислородной регуляции экспрессии *nif*-генов, у *A. caulinodans* выявлен дополнительный путь азотной регуляции, осуществляемой системами NtrB/C и NtrY/X.

IV.C. КОНТРОЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АЗОТФИКСАЦИИ ПРИ СИМБИОЗЕ

При изучении клубеньков недетерминированного типа было показано, что экспрессия *nif*- и *fix*-генов активируется в интерзоне II-III (Yang et al., 1991; Soupene et al., 1995). В настоящее время появляются генетические данные, позволяющие связать экспрессию бактериальных генов азотфиксации и развитие структуры клубеньков. Одним из факторов, обеспечивающих активацию *nif*(*fix*)-генов является изменение концентрации кислорода вдоль продольной оси клубенька (Soupene et al., 1995). Во-первых, при понижении концентрации кислорода в окружающей клубенек атмосфере можно добиться экспрессии генов *nifA*, *fixK* и *fixN* в зоне инвазии II, где эти гены в норме неактивны. К такому же эффекту приводят некоторые мутации по транскрипционному активатору FixJ (при инкубации клубеньков в присутствии нормальных концентраций кислорода). Наличие продольного градиента концентраций кислорода было показано с использованием микроэлектродов: они снижаются от 250 мкМ в апикальной части до 1 мкМ в интерзоне II-III. Таким образом, кислородный барьер вокруг центральной части клубенька в сочетании с высокой дыхательной активностью бактерий и активным синтезом леглобина создает условия для экспрессии генов азотфиксации. Очевидно, что продольный градиент концентрации кислорода может рассматриваться как морфоген, поскольку он определяет специфическую экспрессию генов *nifA*, *fixK* и *fixN*. В отличие от этих генов, *nifA*-зависимые *nif*-гены не проявляют подобной пространственной специфичности активации, что может быть связано с кислород-чувствительностью самого белка NifA, создающей второй уровень контроля над экспрессией *nif*-генов, или же с чувствительностью *nifA* к каким-то еще не известным сигналам (Soupene et al., 1995). Весьма интересным является вопрос о наличии пространственной регуляции кислородом экспрессии *nif*-генов в детерминированных клубеньках, центральная часть которых лишена зональности, характерной для недетерминированных клубеньков.

V. Заключение и перспективы

V.A. СИМБИОТИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ БАКТЕРОИДОВ

За последние 15 лет было выполнено множество работ, направленных на изучение регуляции уже выявленных *nif*-генов, но не на идентификацию новых генов. Поэтому еще предстоит узнать, ограничивается ли число гомологов *nif*-генов *Klebsiella pneumoniae*, выявленных у ризобий, цифрой 10. Можно с достаточной уверенностью говорить об отсутствии у ризобий генов *nifL* (кодирует негативную регуляцию синтеза нитрогеназы в присутствии кислорода или аммония), *nifF* и *nifJ* (кодируют транспорт электронов с пирувата на нитрогеназу, что характерно для анаэроба *Klebsiella*, но не для аэробных ризобий). Функцию последних двух генов у ризобий может выполнять кластер *fixABCX*, характерный для различных аэробных азотфиксаторов.

Особый интерес представляет выявление у ризобий генов *fixNOQP*, кодирующих специфичную для бактериоидов терминальную оксидазу с высоким сродством к кислороду (Preisig et al., 1993). *B. japonicum* представляет собой одну из наиболее хорошо изученных бактерий в отношении биосинтеза цитохромов (Thony-Meyer et al., 1994a; Thony-Meyer, 1997). Среди вопросов биохимии бактериоидов, которые в настоящее время привлекают наибольшее внимание, необходимо отметить поиск альтернативного симбиотического регулятора (ASA) и механизма экскреции аммония.

Все ли существующие для азотфиксации гены ризобий удалось выявить? Это маловероятно, поскольку с использованием метода случайного транспозонного мутагенеза удалось выявить большое количество не идентифицированных *fix*-локусов (Fogai et al., 1983; Putnoky et al., 1988). В то же время ценность этих данных может быть снижена из-за того, что многие симбиотические гены

ризобий дуплицированы. Поэтому необходима тщательная работа для выявления новых генов, входящих в уже известные регуляторные пути, контролируемые факторами *fixLJ*, *nifA* или *fixK*. Новые данные о таких генах могут дать начавшиеся работы по полному секвенированию геномов ризобий (Freiberg et al., 1996, 1997).

V.V. СИГНАЛЫ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ РАЗВИТИЕ И МЕТАБОЛИЗМ КЛУБЕНЬКОВ

При развитии бобово-ризобияльного симбиоза наблюдается дифференциальная экспрессия генов партнеров, которая обеспечивает их тесную метаболическую интеграцию. Можно предположить, что некоторые сигналы являются общими для генов растений и бактерий, хотя и передаются разными путями. Поскольку бактерии наиболее доступны для генетического манипулирования, они могут послужить удобными инструментами для выявления таких сигналов, действующих в клубеньках, что расширит возможность изучения регуляции растительных генов.

Изучение *nif/fix* генов показало, что одним из основных сигналов, активирующих их экспрессию, является низкая концентрация кислорода (Witty et al., 1986; Soupene et al., 1995). Распределение концентраций кислорода в клубеньках в значительной степени определяет топологию экспрессии бактериальных генов. Исходя из высокой энергетической стоимости азотфиксации, можно предположить, что важным сигналом для экспрессии *nif/fix* генов может служить также поступление в клубеньки источников углерода и связанного азота. Задачей будущего является изучение взаимосвязей между углеродным, азотным и кислородным статусом клубенька в связи с регуляцией его симбиотических функций. Недавно было показано, что дикарбоновые кислоты, которые являются основным источником питания бактериоидов, подавляют активность их *nod*-генов. В регуляции гена *ropA* важную роль может играть кальций. Некоторые изменения, наблюдаемые при дифференцировке бактериоидов, могут быть воспроизведены *ex planta*, при выращивании ризобий на сукцинате (Sindhu et al., 1990). Кроме того, сочетание низкой кислотности и присутствия ацетата может оказывать на ризобии бактериостатическое действие (Perez-Goldano, Kahn, 1994). Таким образом, дифференцировка бактериоидов находится под контролем большого количества разнообразных сигналов.

V.C. ПУТИ РЕГУЛЯЦИИ

Несмотря на разнообразие путей регуляции ризобияльных генов в клубеньках, они имеют ряд общих черт: (1) высокая интегрированность, (2) организация в форме “каскадов”, (3) использование гомологичных белков (*FixLJ*, *FixK*, *NifA*) в различных комбинациях.

У ризобий, как и у *Klebsiella*, транскрипция структурных *nif*-генов находится под позитивным контролем гена *nifA*. У ризобий этот ген контролирует также гены *fixABCX*, которые выполняют *nif*-подобные функции, но не имеют гомологов у *Klebsiella*. Это может быть следствием сходных селективных процессов, направляющих эволюцию различных азотфиксаторов. Кроме того, у ризобий под контролем *nifA* находится целый ряд генов, функции которых не связаны с азотфиксацией. К их числу относятся гены синтеза ризопинов, которые определяют эффективность образования клубеньков (Sanjuan, Olivares, 1991; Saint et al., 1993; Batut, Boistard, 1994). Причина включения ризопиновых генов в одну регуляторную сеть с генами азотфиксации окончательно не ясна. Привлекательной является гипотеза о том, что в полевых условиях регуляция азотфиксации и синтеза ризопинов в рамках единого механизма может давать ризобиям дополнительные селективные преимущества.

Почему пути регуляции генов азотфиксации организованы по принципу каскадов? Простейшим биологическим объяснением является то, что такая организация позволяет интегрировать действие нескольких разных сигналов. Однако это объяснение не всегда может считаться достаточным. Так, у *R. meliloti* каскад регуляции *nif*-генов включает факторы *fixLJ* и *nifA*. При этом белки *FixL* и *NifA* реагируют на кислород, и необходимость их объединения не представляется очевидной. Можно лишь предположить, что данные белки реагируют на разные концентрации кислорода, что позволяет

осуществлять тонкую настройку дыхательной цепи перед началом азотфиксации. Кроме того, действие кислорода на белок NifA позволяет предотвращать синтез нитрогеназы при неблагоприятных концентрациях кислорода. Нельзя исключить и того, что белки NifA и FixL являются сенсорами не только кислорода, но и других сигналов. Сходные предположения могут быть справедливы для каскада *fixLJ/fixK*. Экспрессия генов *fixNOPQ* находится под контролем этого каскада у всех трех проанализированных видов ризобий (рис. 4), что показывает эволюционную консервативность данной системы. В то же время, активность белка FixK не зависит от кислорода (Soupe et al., 1995), и до сих пор не выявлен физиологический сигнал, связанный с этим белком.

Почему у ризобий одни и те же регуляторные элементы комбинируются по-разному? При сравнении *nifA*-зависимого каскада и регуляции дыхательного оперона *fixNOPQ* системой *fixLJ/K* можно видеть три разные стратегии (рис. 4). При первых двух стратегиях экспрессия *nifA* находится под *fixLJ*-обусловленным кислородным контролем либо непосредственно (*R. meliloti*), либо опосредовано *fixK* (*A. caulinodans*). У *R. meliloti* эта связь наиболее тесная, так как экспрессия *nifA* полностью отсутствует у мутанта по генам *fixLJ*. У *A. caulinodans* мутанты по генам *fixLJ* сохраняют остаточную экспрессию *nifA* (10% от исходного уровня). В соответствии с третьей стратегией, характерной для *B. japonicum*, ген *nifA* экспрессируется независимо от системы *fixLJ/fixK*. Связь осуществляется на уровне гена *rpoN1*, который находится под контролем *fixLJ* и функционального гомологичен гену *rpoN2*, который экспрессируется независимо от кислорода.

Необходимо отметить, что универсальность каскада *fixLJ/fixK/fixNOPQ* не может считаться доказанной. У *R. leguminosarum* bv. *viciae* экспрессия гена *fixN* может не зависеть от *fixL* (Patschkowski et al., 1996). Дальнейшее изучение регуляции *fixN* у различных ризобий, а также у *Agrobacterium* и у *Rhodobacter capsulatus* позволит показать, действительно ли оперон *fixNOPQ* всегда находится под контролем *fixLJ/fixK* или же могут быть выявлены дополнительные примеры пластичности систем регуляции *nif*-генов. Необходимо выяснить также, являются ли гены *fixLJ* специфичными только для ризобий или они могут присутствовать у разных бактерий, живущих в микроаэрофильных условиях. Ответы на эти вопросы могут представлять большой интерес как в функциональном, так и в эволюционном аспектах.

VI. Благодарности

Авторы признательны Н.-М. Fischer и G. Truchet за предоставление рисунков 2 и 5, а также T. Finan и Н.-М. Fischer за критическое обсуждение рукописи. Авторы просят извинения у тех коллег, чьи работы не были процитированы в статье.

VII. Литература

- Agron P.G., Ditta G.S., Helinski D.R. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 90, p. 3506-3510.
 Aguilar O.M., Reilander H., Arnold W., Puhler A. (1987) J. Bacteriol. V. 169, p. 5393-5400.
 Aguilar O.M., Taormino J., Thony B., Ramscier T., Hennecke H., Szalay A.A. (1990) Mol. Gen. Genet. V. 224, p. 413-420.
 Albright C.M., Huala E., Ausubel F.M. (1989) Annu. Rev. Genet. V. 23, p. 311-336.
 Anthamatten D., Hennecke H. (1991) Mol. Gen. Genet. V. 225, p. 38-48.
 Anthamatten D., Scherb B., Hennecke H. (1992) J. Bacteriol. V. 174, p. 2111-2120.
 Appleby C.A. (1984) Annu. Rev. Plant. Physiol. V. 35, p. 443-478.
 Arcondeguy T., Huez I., Fournier J., Kahn D. (1996) FEMS Lett. V. 145, p. 33-40.
 Arigoni F. (1992) PhD Thesis. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich.
 Arigoni F., Kaminski P.A., Celli J., Elmerich C. (1992) Mol. Gen. Genet. V. 235, p. 422-431.
 Arigoni F., Kaminski P.A., Hennecke H., Elmerich C. (1991) Mol. Gen. Genet. V. 225, p. 514-520.
 Arnold W., Rump A., Klipp W., Priefer U.B., Puhler A. (1988) J. Mol. Biol. V. 203, p. 715-738.
 Austin S., Dixon R. (1992) EMBO J. V. 11, p. 2219-2228.
 Barrios H., Fischer H.-M., Hennecke H., Morett E. (1995) J. Bacteriol. V. 177, p. 1760-1765.
 Batut J., Boistard P. (1994) Antonie van Leeuwenhoek. V. 66, p. 129-150.
 Batut J., Davaeran M.M., David M., Jacobs J., Garmerone A.M., Kahn D. (1989) EMBO J. V. 8, p. 1279-1286.
 Batut J., Santero E., Kustu S. (1991) J. Bacteriol. V. 173, p. 5914-5917.
 Bender G.L., Plazinski J., Rolfe B.G. (1986) Appl. Environ. Microbiol. V. 51, p. 868-871.
 Berger D.K., Narberhaus F., Kustu S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 91, p. 103-107.
 Bergersen F.J., Turner G.L. (1967) Biochim. Biophys. Acta. V. 141, p. 507-515.
 Bergersen F.J., Turner G.L., Gibson A.H., Dudman W.E. (1976) Biochim. Biophys. Acta. V. 444, p. 164-174.
 Beynon J.L., Williams M.K., Cannon F.C. (1988) EMBO J. V. 7, p. 7-14.

- Bishop P.E., Premakumar R. (1992). In: Stacey G., Burris R.H., Evans H.J. (eds). *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman and Hall, NY, p. 736-762.
- Bolton E., Higginson B., Harrington A., O'Gara F. (1986) *Arch. Microbiol.* V. 144, p. 142-146.
- Bott M., Bolliger M., Hennecke H. (1990) *Mol. Microbiol.* V. 4, p. 2147-2157.
- Bott M., Preisig O., Hennecke H. (1992) *Arch. Microbiol.* V. 158, p. 335-343.
- Bott M., Ritz D., Hennecke H. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 6766-6772.
- Bott M., Thony-Meyer L., Loferer H., Rossbach S., Tully R.E., Keister D., Appleby C.A., Hennecke H. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 2214-2217.
- Brigle K.E., Weiss M.C., Newton W.E., Dean D.E. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 1574-1553.
- Buikema W.J., Klingensmith J.A., Gibbons S.L., Ausubel F.M. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 1120-1126.
- Carlson T.A., Chelm B.K. (1986) *Nature*. V. 322, p. 568-570.
- Carlson T.A., Guerinot M.L., Chelm B.K. (1985) *J. Bacteriol.* V. 162, p. 698-703.
- Carlson T.A., Martin G.B., Chelm B.K. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 5861-5866.
- Cherfils J., Gibrat J.F., Levin F., Batut J., Kahn D. (1989) *J. Mol. Recogn.* V. 2, p. 114-121.
- Chiurazzi M., Meza R., Lara M., Lahm A., Defez R., Iaccarino M., Espin G. (1992) *Gene*. V. 119, p. 1-8.
- Colonna R.S., Arnold W., Schluter A., Boistard P., Puhler A., Priefer U.B. (1990) *Mol. Gen. Genet.* V. 223, p. 138-147.
- Colonna R.S., Riccio A., Guida M., Defez R., Lamberti A., Iaccarino M., Arnold W., Priefer U., Puhler A. (1987) *Nucleic Acids. Res.* V. 15, p. 1951-1964.
- Corbin D., Ditta G., Helinski D.R. (1982) *J. Bacteriol.* V. 149, p. 221-228.
- Cullimore J.V., Bennett M.J. (1992) *Can. J. Microbiol.* V. 38, p. 461-466.
- D'hooghe I., Michiels I., Vlassak K., Verreth C., Waelkens F., Vanderleyden J. (1995) *Mol. Gen. Genet.* V. 249, p. 117-126.
- Da Re S., Bertagnoli S., Fourment J., Reytrat J.M., Kahn D. (1994) *Nucleic Acids. Res.* V. 22, p. 1555-1561.
- David M., Davaeran M.L., Batut J., Dedieu A., Domergue O., Ghai J., Hertig C., Boistard P., Kahn D. (1988) *Cell*. V. 54, p. 671-683.
- David M., Domergue O., Pognonec P., Kahn D. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 2239-2244.
- Day D.A., Copeland L. (1991) *Plant. Physiol. Biochem.* V. 29, p. 185-201.
- Day D.A., Price G.D., Udvardi M.K. (1989) *Austral. J. Plant. Physiol.* V. 16, p. 69-84.
- De Billy F., Barker D.G., Gallusci P., Truchet G. (1991) *The Plant J.* V. 1, p. 27-35.
- De Bruijn F.J., Rossbach S., Schneider M., Ratet P., Messmer S., Szeto W.W., Ausubel F.M., Schell J. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 1673-1682.
- De Maagd R., de Rijk R., Mulders I.H., Lugtenberg B.J.J. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 1136-1142.
- De Maagd R., Mulders I.H., Canter C.H., Lugtenberg B.J.J. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 214-221.
- De Maagd R., Yang W.-C., Goosen-de Roo L., Mulders I.H., Roest H.P., Spaink H.P., Bisseling T., Lugtenberg B.J.J. (1994) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 7, p. 276-281.
- De Philip P., Batut J., Boistard P. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 4255-4262.
- De Philip P., Soupene E., Batut J., Boistard P. (1992) *Mol. Gen. Genet.* V. 235, p. 49-54.
- Dean D.R., Jacobson M.R. (1992) In: Stacey G., Burris R.H., Evans H.J. (eds). *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman and Hall, NY, p. 763-834.
- Delgado M.J., Yeoman K.H., Wu G., Vargas C., Davies A.E., Poole R.K., Johnston A.W., Downie J.A. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 4927-4934.
- Deneffe P., Kush A., Norel F., Paquelin A., Elmerich C. (1987) *Mol. Gen. Genet.* V. 207, p. 280-287.
- Ditta G., Virts E., Palomares A., Kim C.H. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 3217-3223.
- Donald R.G., Ludwig R.A. (1984) *J. Bacteriol.* V. 158, p. 1144-1151.
- Dreyfus B., Elmerich C., Dommergues Y.R. (1983) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 45, p. 711-713.
- Dreyfus B., Garcia J.L., Gillis M. (1988) *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 38, p. 89-98.
- Drummond M., Whitty P., Wootton J. (1986) *EMBO J.* V. 5, p. 441-447.
- Dusha I., Kovalenko S., Banfalvi Z., Kondorosi A. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 1403-1409.
- Earl C.D., Ronson C.W., Ausubel F.M. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 1127-1136.
- Ebeling S., Hahn M., Fischer H.-M., Hennecke H. (1987) *Mol. Gen. Genet.* V. 207, p. 503-508.
- Ebeling S., Noti J.D., Hennecke H. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 1999-2001.
- Eichler K., Buchet A., Bourgis F., Kleber H.P., Mandrand-Berthelot M.A. (1995) *J. Basic Microbiol.* V. 35, p. 217-227.
- Elmerich C., Dreyfus B.L., Reyssat G., Aubert J.P. (1982) *EMBO J.* V. 1, p. 499-503.
- Engelke T.H., Jagadish M.N., Puhler A. (1987) *J. Gen. Microbiol.* V. 133, p. 3019-3029.
- Engelke T.H., Jording D., Kapp D., Puhler A. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 5551-5560.
- Espin G., Moreno S., Wild M., Meza R., Iaccarino M. (1990) *Mol. Gen. Genet.* V. 223, p. 513-516.
- Evans D., Jones R., Woodley P., Robson R. (1988) *J. Gen. Microbiol.* V. 134, p. 931-942.
- Finan T.M., Wood J.M., Jordan D.C. (1983) *J. Bacteriol.* V. 154, p. 1403-1413.
- Finocchiaro G., Colombo I., Garavaglia B., Gellera C., Valdemari G., Garbuglio N., Didonato S. (1993) *Eur. J. Biochem.* V. 213, p. 1003-1008.
- Fischer H.-M. (1994) *Microbiol. Rev.* V. 58, p. 352-386.
- Fischer H.-M. (1996) *Trends in Microbiol.* V. 4, p. 317-320.
- Fischer H.-M., Alvarez-Morales A., Hennecke H. (1986) *EMBO J.* V. 5, p. 1165-1173.
- Fischer H.-M., Bruderer T., Hennecke H. (1988) *Nucleic Acids Res.* V. 16, p. 2207-2224.
- Fischer H.-M., Hennecke H. (1984) *Mol. Gen. Genet.* V. 196, p. 537-540.

- Fischer H.-M., Hennecke H. (1987) *Mol. Gen. Genet.* V. 209, p. 621-626.
- Fogher C., Dusha I., Barbot P., Elmerich C. (1985) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 30, p. 245-249.
- Forrai T., Vincze E., Banfalvi Z., Kiss G.B., Randhawa G.S., Kondorosi A. (1983) *J. Bacteriol.* V. 153, p. 635-643.
- Foussard M., Garnerone A.M., Ni F., Soupene E., Boistard P., Batut J. (1997) *Mol. Microbiol.* V. 25, p. 27-37.
- Franssen H.J., Vijn I., Yang W.C., Bisseling T. (1992) *Plant Mol. Biol.* V. 19, p. 89-107.
- Freiberg C., Fellay R., Bairoch A., Broughton W.J., Rosenthal A., Perret X. (1997) *Nature.* V. 387, p. 394-401.
- Freiberg C., Perret X., Broughton W.J., Rosenthal A. (1996) *Genome Res.* V. 6, p. 590-600.
- Fuhrmann M., Fischer H.-M., Hennecke H. (1985) *Mol. Gen. Genet.* V. 199, p. 315-322.
- Galimand M., Perroud B., Delorme F., Paquelm A., Vieille C., Bozouklian H., Elmerich C. (1989) *J. Gen. Microbiol.* V. 135, p. 1047-1059.
- Galinier A., Garnerone A.M., Reytrat J.M., Kahn D., Batut J., Boistard P. (1994) *J. Biol. Chem.* V. 269, p. 23784-23789.
- Gebhardt C., Turner G.L., Gibson A.H., Dreyfus B.L., Bergersen F.J. (1984) *J. Gen. Microbiol.* V. 130, p. 843-848.
- Gilles-Gonzalez M.A., Ditta G.S., Helinski D.R. (1991) *Nature.* V. 150, p. 170-172.
- Gilles-Gonzalez M.A., Gonzalez G. (1993) *J. Biol. Chem.* V. 268, p. 16293-16297.
- Glazebrook J., Ichige A., Walker G.C. (1993) *Genes & Dev.* V. 7, p. 1485-1497.
- Goodman S.I., Axtell K.M., Bindoff L.A., Beard S.E., Gill R.E., Frerman F.E. (1994) *Eur. J. Biochem.* V. 219, p. 277-286.
- Gordon A.J. (1995) In: Tikhonovich I. et al. (eds). *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, p. 533-538.
- Gosink M.M., Franklin N.M., Roberts G.P. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 1441-1447.
- Gronger P., Manian S.S., Reilander H., O'Connell M., Priefer U.B., Puhler A. (1987) *Nucleic Acids Res.* V. 15, p. 31-49.
- Gubler M., Hennecke H. (1986) *FEBS Lett.* V. 200, p. 186-192.
- Gubler M., Hennecke H. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 1205-1214.
- Gubler M., Zurcher T., Hennecke H. (1989) *Mol. Microbiol.* V. 3, p. 141-148.
- Gussin G.N., Ronson C.W., Ausubel F.M. (1986) *Annu. Rev. Genet.* V. 20, p. 567-591.
- Hennecke H. (1990) *FEBS Lett.* V. 268, p. 422-426.
- Hertig C., Li R.Y., Louam A.M., Garnerone A.M., David M., Batut J., Kahn D., Boistard P. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 1736-1738.
- Hill S. (1992) In: G. Stacey, R.H. Burris, H.J. Evans (eds). *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman and Hall, NY, London, p. 87-134.
- Hill S., Austin S., Eydmann T., Jones T., Dixon R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 93, p. 2143-2148.
- Hirsch A.M., Bang M., Ausubel F.M. (1983) *J. Bacteriol.* V. 155, p. 367-380.
- Hirsch A.M., Smith C.A. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 1137-1146.
- Huala E., Ausubel F.M. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 3354-3365.
- Humbeck C., Werner D. (1987) *Curr. Microbiol.* V. 14, p. 259-262.
- Iismaa S.E., Ealing P.M., Scott K.F., Watson J.M. (1989) *Mol. Microbiol.* V. 3, p. 1753-1764.
- Iismaa S.E., Watson J.M. (1987) *Nucleic Acids Res.* V. 15, p. 318.
- Iismaa S.E., Watson J.M. (1989) *Mol. Microbiol.* V. 3, p. 943-955.
- Jiang J., Gu B., Albright L.M., Nixon T.B. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 5244-5253.
- Jording D., Puhler A. (1993) *Mol. Gen. Genet.* V. 241, p. 106-114.
- Kahn D. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 8, p. 786-787.
- Kahn D., Batut J., Davaeran M.-L., Fourment J. (1993). In: Palacios R., Mora J., Newton W.E. (eds). *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 474.
- Kahn D., David M., Domergue O., Davaeran M.L., Ghai J., Hirsch P.R., Batut J. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 929-939.
- Kahn D., Ditta G. (1991) *Mol. Microbiol.* V. 5, p. 987-997.
- Kaluza K., Fuhrmann M., Hahn M., Regensburger B., Hennecke H. (1983) *J. Bacteriol.* V. 155, p. 915-918.
- Kaluza K., Hennecke H. (1984) *Mol. Gen. Genet.* V. 196, p. 35-42.
- Kaminski P.A., Desnoves N., Elmerich C. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 91, p. 4663-4667.
- Kaminski P.A., Elmerich C. (1991) *Mol. Microbiol.* V. 5, p. 665-673.
- Kaminski P.A., Kitts C.L., Zimmerman Z., Ludwig R.A. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 5989-5994.
- Kaminski P.A., Mandon K., Arigoni F., Desnoves N., Elmerich C. (1991) *Mol. Microbiol.* V. 5, p. 1983-1991.
- Kaminski P.A., Norel F., Desnoves N., Kush A., Salzano G., Elmerich C. (1988) *Mol. Gen. Genet.* V. 214, p. 496-502.
- Kardailsky I., Yang W.C., Zalensky A., van Kammen A., Bisseling T. (1993) *Plant. Mol. Biol.* V. 23, p. 1029-1037.
- Kaufman R.I., Nixon T.B. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 3967-3970.
- Keister D.L. (1975) *J. Bacteriol.* V. 123, p. 1265-1268.
- Kereszt A., Slaska K.K., Putnok P., Banfalvi Z., Kondorosi A. (1995) *Mol. Gen. Genet.* V. 247, p. 39-47.
- Kim S., Burgess B.K. (1996) *J. Biol. Chem.* V. 271, p. 9764-9770.
- Kitts C.L., Ludwig R.A. (1994) *J. Bacteriol.* V. 176, p. 886-895.
- Klipp W., Reilander H., Schluter A., Krey R., Puhler A. (1989) *Mol. Gen. Genet.* V. 216, p. 293-302.
- Knight C.D., Rossen L., Robertson J.G., Wells B., Downie A.J. (1986) *J. Bacteriol.* V. 166, p. 552-558.
- Krey R., Puhler A., Klipp W. (1992) *Mol. Gen. Genet.* V. 234, p. 433-441.
- Kullik I., Fritsche S., Knobel H., Sanjuan J., Hennecke H., Fischer H.-M. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 1125-1138.
- Kurz W.G.W., LaRue T.A. (1975) *Nature.* V. 256, p. 407-409.
- Kustu S., Santero E., Keener J., Popham D., Weiss D. (1989) *Microbiol. Rev.* V. 53, p. 367-376.
- Labes M., Rastogi V., Watson R., Finan T.M. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 2662-2673.

- Liu Y., Kahn M.L. (1995) J. Biol. Chem. V. 270, p. 1624-1628.
- Lois A.F., Ditta G.S., Helinski D.R. (1993) J. Bacteriol. V. 175, p. 1103-1109.
- Lois A.F., Weinstein M., Ditta G.S., Helinski D.R. (1993) J. Biol. Chem. V. 268, p. 4370-4375.
- Loroch A., Nguyen B.G., Ludwig R.A. (1995) J. Bacteriol. V. 177, p. 7210-7221.
- Ludwig R.A. (1978) J. Bacteriol. V. 135, p. 114-123.
- Ludwig R.A. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 81, p. 1566-1569.
- Lukat G.S., McCleary W.R., Stock A.M., Stock J.B. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 89, p. 718-722.
- Manco G., Rossi M., Defez R., Lamberti A., Percuoco G., Iaccarino M. (1992) J. Gen. Microbiol. V. 138, p. 1453-1460.
- Mandon K., Kaminski P.A., Elmerich C. (1994) J. Bacteriol. V. 176, p. 2560-2568.
- Mandon K., Kaminski P.A., Mougél C., Desnoues N., Dreyfus B., Elmerich C. (1993) FEMS Microbiol. Lett. V. 114, p. 185-189.
- Margolin W., Bramhill D., Long S.R. (1995) J. Bacteriol. V. 177, p. 2892-2900.
- Margolin W., Corbo J.C., Long S.R. (1991) J. Bacteriol. V. 173, p. 5822-5830.
- Margolin W., Long S.R. (1994) J. Bacteriol. V. 176, p. 2033-2043.
- Mavridou A., Bamy M.A., Poole P., Plaskitt K., Davies A.E., Johnston A.W., Downie J.A. (1995) Microbiology. V. 141, p. 103-111.
- McComb J.A., Elliott J., Dilworth M.J. (1975) Nature. V. 256, p. 409-410.
- McDermott T.R., Kahn M.L. (1992) J. Bacteriol. V. 174, p. 4790-4797.
- Mcerrick M.J. (1992). In: G. Stacey, R. H. Burris, H. J. Evans (eds). Biological Nitrogen Fixation. Chapman & Hall, NY, p. 835-876.
- Michiels J., Vanderleyden J. (1993) Biochim. Biophys. Acta. V. 1144, p. 232-233.
- Miller R.W., McRae D.G., Joy K. (1991) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 4, p. 37-45.
- Monson E.K., Ditta G.S., Helinski D.R. (1995) J. Biol. Chem. V. 270, p. 5243-5250.
- Monson E.K., Weinstein M., Ditta G.S., Helinski D.R. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 89, p. 4280-4284.
- Moreno S., Meza R., Guzman J., Carabez A., Espin G. (1991) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 4, p. 619-622.
- Morett E., Fischer H.-M., Hennecke H. (1991) J. Bacteriol. V. 173, p. 3478-3487.
- Muffler A., Fischer D., Hengge-Aronis R. (1996) Genes & Dev. V. 10, p. 1143-1151.
- Nixon B.T., Ronson C.W., Ausubel F.M. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 83, p. 7850-7854.
- Norel F., Desnoues N., Elmerich C. (1985) Mol. Gen. Genet. V. 199, p. 352-356.
- Norel F., Elmerich C. (1987) J. Gen. Microbiol. V. 133, p. 1563-1576.
- O'Brian M.R., Maier R.J. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 84, p. 3219-3223.
- Pagan J.D., Child J.J., Scowcroft W.R., Gibson A.H. (1975) Nature. V. 256, p. 406-407.
- Parkinson J.S., Kofoid E.C. (1992) Annu. Rev. Genet. V. 26, p. 71-112.
- Patriarca E.J., Tate R., Fedorova E., Riccio A., Defez R., Iaccarino M. (1996) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 9, p. 243-251.
- Patschkowski T., Schluter A., Priefer U.B. (1996) Mol. Microbiol. V. 21, p. 267-280.
- Paustian T., Shah V.K., Roberts G.P. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 86, p. 6082-6086.
- Pawlowski K., Klose U., de Bruijn F.J. (1991) Mol. Gen. Genet. V. 231, p. 124-138.
- Perez-Goldano R., Kahn M.L. (1994) Microbiology. V. 140, p. 1231-1235.
- Preisig O., Anthamatten D., Hennecke H. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 90, p. 3309-3313.
- Preisig O., Zufferey R., Hennecke H. (1996b) Arch. Microbiol. V. 165, p. 297-305.
- Preisig O., Zufferey R., Thony-Meyer L., Appleby C.A., Hennecke H. (1996a) J. Bacteriol. V. 178, p. 1532-1538.
- Putnoky P., Grosskopf E., Ha D.T., Kiss G.B., Kondorosi A. (1988) J. Cell. Biol. V. 106, p. 597-607.
- Quinto C., De la Vega H., Flores M., Fernandez L., Ballado T., Soberon G., Palacios R. (1982) Nature. V. 299, p. 724-726.
- Quinto C., De la Vega H., Flores M., Leemans J., Cevallos M.A., Pardo M.A., Azpiroz R., Girard M.L., Calva E., Palacios R. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 82, p. 1170-1174.
- Ramseier T.M., Winteler H.V., Hennecke H. (1991) J. Biol. Chem. V. 266, p. 7793-7803.
- Ratet P., Pawlowski K., Schell J., de Bruijn F.J. (1989) Mol. Microbiol. V. 3, p. 825-838.
- Reitzer L.J., Magasanik B. (1987). In: Neidhardt F.C. et al. (eds), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., p. 302-320.
- Renalier M.H., Batut J., Ghai J., Terzaghi B., Gherardi M., David M., Garnerone A.M., Vasse J., Truchet G., Huguet T., Boistard P. (1987) J. Bacteriol. V. 169, p. 2231-2238.
- Reyrat J.M., David M., Blonski C., Boistard P., Batut J. (1993) J. Bacteriol. V. 175, p. 6867-6872.
- Riedel K.U., Jouanneau Y., Masepohl B., Puhler A., Klipp W. (1995) Eur. J. Biochem. V. 231, p. 742-746.
- Ritz D., Bott M., Hennecke H. (1993) Mol. Microbiol. V. 9, p. 729-740.
- Ritz D., Thony-Meyer L., Hennecke H. (1995) Mol. Gen. Genet. V. 247, p. 27-38.
- Roest H.P., Goosen-de Roo L., Wijffelman C.A., de Maagd R.A., Lugtenberg B.J.J. (1995a) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 8, p. 14-22.
- Roest H.P., Mulders I.H., Wijffelman C.A., Lugtenberg B.J.J. (1995b) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 8, p. 576-583.
- Ronson C.W. (1988). In: Bothe H., de Bruijn F.J., Newton W.E. (eds). Nitrogen Fixation: Hundred Years After. Gustav Fischer, Stuttgart, NY, p. 547-557.
- Ronson C.W., Astwood P.M. (1985). In: Evans H.J., Bottomley P.J., Newton W.E. (eds). Nitrogen Fixation Research Progress. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, p. 201-207.
- Ronson C.W., Astwood P.M., Downie J.A. (1984) J. Bacteriol. V. 160, p. 903-909.
- Ronson C.W., Astwood P.M., Nixon B.T., Ausubel F.M. (1987b) Nucl. Acids. Res. V. 15, p. 7921-7934.
- Ronson C.W., Lyttleton P., Robertson J.G. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 78, p. 4284-4288.

- Rossi M., Defez R., Chiruzzi M., Lamberti A., Fuggi A., Iaccarino M. (1989) *J. Gen. Microbiol.* V. 135, p. 629-637.
- Ruvkun G.B., Ausubel F.M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 77, p. 191-195.
- Ruvkun G.B., Ausubel F.M. (1981) *Nature.* V. 289, p. 85-89.
- Ruvkun G.B., Sundaresan V., Ausubel F.M. (1982) *Cell.* V. 29, p. 551-559.
- Saint C.P., Wexler M., Murphy P.J., Tempe J., Tate M.E., Murphy P.J. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 5205-5215.
- Sanders D.A., Gillette C.B., Burlingame A.L., Koshland D.J. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 5117-5122.
- Sanjuan J., Olivares J. (1991) *Arch. Microbiol.* V. 155, p. 543-548.
- Schlaman H.R., Horvath B., Vijgenboom E., Okker R.J., Lugtenberg B.J.J. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 4277-4287.
- Schlaman H.R., Lugtenberg B.J.J., Okker R.J. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 6109-6116.
- Schluter A., Patschkowski T., Unden G., Priefer U.B. (1992) *Mol. Microbiol.* V. 6, p. 3395-3404.
- Schluter A., Patschkowski T., Weidner S., Unden G., Hynes M.F., Priefer U.B. (1993). In: Palacios R., Mora J., Newton W.E. (eds), *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 493.
- Schluter A., Ruberg S., Kramer M., Weidner S., Priefer U.B. (1995) *Mol. Gen. Genet.* V. 247, p. 206-215.
- Scott K.F., Rolfe B.G., Shine J. (1983) *DNA.* V. 2, p. 141-148.
- Shatters R.G., Kahn M.L. (1989) *J. Mol. Evol.* V. 29, p. 422-428.
- Shatters R.G., Liu Y., Kahn M.L. (1993) *J. Biol. Chem.* V. 268, p. 469-475.
- Shaw D.J., Rice D.W., Guest J.R. (1983) *J. Mol. Biol.* V. 166, p. 241-247.
- Sindhu S.S., Brewin N.J., Kannenberg E.L. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 1804-1813.
- Smith B.E., Roe S.M., Yousafzai F.K. (1995) In: Tikhonovich I.A., Provorov N.A., Romanov V.I., Newton W.E. (eds). *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, p. 19-27.
- Soberon M., Aguilar G.R., Sanchez F. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 8, p. 159-166.
- Somerville J.E., Kahn M.L. (1983) *J. Bacteriol.* V. 156, p. 168-176.
- Soupe E., Foussard M., Boistard P., Truchet G., Batut J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 92, p. 3759-3763.
- Stam H., van Verseveld H.W., Stouthamer A.H. (1983) *Arch. Microbiol.* V. 135, p. 199-204.
- Stigter J., Schneider M., de Bruijn F.J. (1993) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 6, p. 238-252.
- Szeto W.W., Nixon B.T., Ronson C.W., Ausubel F.M. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 1423-1432.
- Szeto W.W., Zimmerman J.L., Sundaresan V., Ausubel F.M. (1984) *Cell.* V. 36, p. 1035-1043.
- Thony B., Fischer H.-M., Anthamatten D., Bruderer T., Hennecke H. (1987) *Nucl. Acids Res.* V. 15, p. 8479-8499.
- Thony-Meyer L. (1997) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* V. 61, p. 337-376.
- Thony-Meyer L., Beck C., Preisig O., Hennecke H. (1994b) *Mol. Microbiol.* V. 14, p. 705-716.
- Thony-Meyer L., Ritz D., Hennecke H. (1994a) *Mol. Microbiol.* V. 12, p. 1-9.
- Thony-Meyer L., Stax D., Hennecke H. (1989) *Cell.* V. 57, p. 683-697.
- Tyerman S.D., Whitehead L.F., Day D.A. (1995) *Nature.* V. 378, p. 629-632.
- Udvardi M.K., Price D.G., Gresshoff P.M., Day D.A. (1988) *FEBS Lett.* V. 231, p. 36-40.
- Valderrama B., Davalos A.G., Morett L.E., Mora J. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 3119-3126.
- Van Slooten J.C., Bhuvanavari T.V., Bardin S., Stanley J. (1992) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 5, p. 179-186.
- Van Slooten J.C., Cervantes E., Broughton W.J., Wong C.H., Stanley J. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 5563-5574.
- Vargas C., Wu G.H., Delgado M.J., Poole R.K., Downie J.A. (1996) *Microbiology.* V. 142, p. 41-46.
- Vasse J., de Bruijn F.J., Camut S., Truchet G. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 4295-4306.
- Wackens F., Foglia A., Morel J.B., Fournier J., Batut J., Boistard P. (1992) *Mol. Microbiol.* V. 6, p. 1447-1456.
- Wang Y.P., Birkenhead K., Boesten B., Manian S., O'Gara F. (1989) *Gene.* V. 85, p. 135-144.
- Watson R.J. (1990) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 3, p. 174-181.
- Watson R.J., Chan Y.K., Wheatcroft R., Yang A.F., Han S.H. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 927-934.
- Weidenhaupt M., Rossi P., Beck C., Fischer H.-M., Hennecke H. (1996) *Arch. Microbiol.* V. 165, p. 169-178.
- Weiss D.S., Batut J., Klose K.E., Keener J., Kustu S. (1991) *Cell.* V. 67, p. 155-167.
- Witty J.F., Minchin F.R., Skot L., Sheehy J.E. (1986). In: *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*. Oxford University Press, Oxford, p. 275-314.
- Yang W.C., Horvath B., Hontelez J., Van Kammen A., Bisseling T. (1991) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 4, p. 464-468.
- Yarosh O.K., Charles T.C., Finan T.M. (1989) *Mol. Microbiol.* V. 3, p. 813-823.
- Yorgey P., Kolter P. (1993) *Trends in Genetics.* V. 9, p. 374-375.
- Young J.P.W. (1992). In: Stacey G., Burris R.H., Evans H.J. (eds). *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman and Hall, NY, p. 43-86.
- Yuen J., Stacey G. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 424-428.
- Yun A.C., Szalay A.A. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 81, p. 7358-7362.
- Yura T., Mori H., Nagai H., Nagata T., Ishihama A., Fujita N., Isono K., Mizobuchi K., Nakata A. (1992) *Nucl. Acids Res.* V. 20, p. 3305-3308.
- Zheng L., White R.H., Cash V.L., Jack R.F., Dean D.R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 90, p. 2754-2758.
- Zimmerman J.L., Szeto W.W., Ausubel F.M. (1983) *J. Bacteriol.* V. 156, p. 1025-1034.
- Zufferey R., Preisig O., Hennecke H., Thony-Meyer L. (1996) *J. Biol. Chem.* V. 271, p. 9114-9119.

Метаболизм углерода и азота у ризобий

Кан М., Макдермот Т.Р., Удварди М.К.

I.	Введение.....	493
II.	Метаболизм углерода и азота у свободноживущих ризобий.....	494
II.A.	Метаболизм азота.....	494
II.A.1.	Ассимиляция нитратов.....	494
II.A.2.	Азотфиксация.....	495
II.A.3.	Ассимиляция аммония.....	495
II.A.4.	Метаболизм аминокислот и нуклеотидов.....	497
II.B.	Регуляция азотного метаболизма.....	497
II.C.	Метаболизм углерода.....	497
II.C.1.	C-1, C-2, C-3 соединения.....	497
II.C.2.	C-4 соединения.....	498
II.C.3.	C-5 соединения.....	499
II.C.4.	C-6 соединения.....	499
II.C.5.	Дисахариды.....	500
II.C.6.	Ароматические соединения.....	500
III.	Интеграция метаболизма бактериоидов и растительных клеток в клубеньках.....	501
III.A.	Создание в клубеньках микроаэрофильных условий, необходимых для азотфиксации.....	501
III.B.	Метаболизм углерода в растениях.....	501
III.C.	Метаболизм углерода в клубеньках.....	502
III.C.1.	Какие соединения углерода поступают в бактериоиды при азотфиксации?.....	502
III.C.2.	Регуляция цикла трикарбоновых кислот и переход углерода на другие метаболические пути.....	505
III.C.3.	Метаболизм ацетил-CoA.....	506
III.C.4.	Метаболизм поли-β-гидроксibuтирата.....	506
III.C.5.	Синтез других углеродных соединений.....	509
III.D.	Метаболизм и экспорт азота в бактериоидах.....	510
III.D.1.	Азотфиксация.....	510
III.D.2.	Ассимиляция азота.....	510
III.D.3.	Метаболизм аминокислот.....	510
III.E.	Метаболизм азота у растений.....	512
IV.	Выводы и перспективы.....	512
V.	Литература.....	513

I. Введение

Rhizobiaceae - семейство аэробных почвенных бактерий, которые могут формировать мутуалистические или паразитарные ассоциации с высшими растениями. Жизнь в почве затруднена тем, что ее условия весьма изменчивы в пространстве и времени. Как и другие почвенные бактерии, *Rhizobiaceae* обладают широкими метаболическими возможностями, что позволяет им расти и

размножаться при изменяющихся внешних условиях. Например, *Rhizobiaceae* могут расти на многих неорганических и органических источниках азота, включая N_2 , нитраты, нитриты, аммоний и аминокислоты. Метаболизм соединений углерода и азота состоит из ряда путей, одни из которых широко распространены у почвенных микроорганизмов, а другие встречаются редко. Бактерии семейства *Rhizobiaceae*, наряду с общими метаболическими путями, имеют ряд особых путей, свойственных только этому семейству. Уникальными являются и некоторые пути вторичного метаболизма, благодаря которым продуцируются сигнальные молекулы и особые компоненты клеточной поверхности, участвующие в становлении или поддержании специфических ассоциаций с растениями.

Высшие растения - основные автотрофы в наземных экосистемах - являются поставщиками восстановленного углерода для большинства наземных организмов, включая микробов почвы. Для почвенной биоты растения являются потенциальными источниками и других питательных элементов. Растения обеспечивают относительно стабильную и благоприятную среду для любых микроорганизмов, которые могут формировать и поддерживать с ними тесный контакт. Однако процесс симбиоза требует глубокой интеграции микробных и растительных метаболических систем, что и определило стратегию эволюции симбиотических бактерий. Интеграция метаболических процессов бактерий *Rhizobiaceae* и растений-хозяев осуществляется двумя путями. При азотфиксирующем симбиозе, в котором участвуют бобовые (и некоторые небобовые) и представители родов *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* и *Azorhizobium* (имеющих общее название ризобии), ключевую роль играет обмен восстановленного углерода растений на восстановленный азот бактерий. В основе этого обмена лежат сложные и координированные изменения в метаболизме углерода и азота у обоих организмов. В противоположность этому, у представителей рода *Agrobacterium* гораздо меньше возможностей для получения углерода и азота от растений-хозяев. Агробактерии передают часть своей ДНК (Т-ДНК) в ядра растительных клеток. Т-ДНК кодирует ферменты, переводящие поток растительного углерода и азота в специальные вещества, называемые опинами, которые могут потреблять только данные бактерии.

По отношению к растениям бактерии *Rhizobiaceae* разделяют на две категории - стимулирующие и ингибирующие рост. В данной главе мы будем рассматривать в основном организацию и регуляцию метаболизма углерода и азота у ризобий, стимулирующих рост растений. Метаболизм свободноживущих и симбиотических бактерий будет рассмотрен для того, чтобы показать их физиологическую пластичность, а также специфичность, которая позволяет интегрировать метаболические пути бактерий и растений при симбиозе.

II. Метаболизм углерода и азота у свободноживущих ризобий

II.A. МЕТАБОЛИЗМ АЗОТА

Ризобии обычно являются прототрофами, однако иногда для их роста требуются витамины или аминокислоты (Chakrabarti et al., 1981). Поэтому при выращивании ризобий часто используют дрожжевой экстракт или другие сложные среды. Однако большая часть наших знаний о метаболизме азота у ризобий получена в опытах *in vitro* с чистыми штаммами, растущими на определенных минимальных средах. Общей особенностью ризобий является их способность использовать неорганические вещества - нитраты, нитриты и аммоний, в качестве единственных источников азота. Хотя ризобии обладают полным набором генов, необходимых для фиксации молекулярного азота, большинство штаммов проявляет это свойство только при симбиозе. Исключение составляет *Azorhizobium*, который может использовать N_2 в качестве единственного источника азота при росте в чистой культуре.

II.A.1. Ассимиляция нитратов

Ряд бактерий, включая *Klebsiella pneumoniae* (Thayer, Huffaker, 1982) и *Pseudomonas fluorescens* (Betlach et al., 1981), обладают энергетически зависимыми переносчиками нитратов. Сходные системы, возможно, существуют у ризобий, хотя они еще детально не охарактеризованы. После

поступления нитрата в клетку он восстанавливается до аммония путем двухэтапного процесса с использованием нитратредуктазы и нитритредуктазы. Ризобии имеют две нитратредуктазы: фермент ассимиляции, который требуется для роста на нитрате при аэробных условиях (Sik, Barabas, 1977; Kiss et al., 1979), и фермент диссимиляции, который использует нитрат как конечный акцептор электронов при анаэробном дыхании (Cheniae, Evans, 1960; Daniel, Appleby, 1972; Manhart, Wong, 1979; Streeter, deVine, 1983; Gollop, Avissar, 1984). Ассимилирующая нитратредуктаза регулируется нитратом (Monza et al., 1972; Manhart, Wong, 1979; Howitt et al., 1988) через общую азотрегулирующую систему (см. ниже), в то время как диссимилирующая нитратредуктаза регулируется кислородом (Daniel, Appleby, 1972; O'Hara et al., 1983). Ассимилирующая нитратредуктаза восстанавливает нитрат до нитрита, который затем при помощи нитритредуктазы восстанавливается до аммония. Пока еще мало известно о нитритредуктазах ризобий, но возможно, что они могут использовать различные ферменты для ассимиляции нитрита и его диссимиляции до газообразных форм азота (Giannakis et al., 1988).

II.A.2. Азотфиксация

Ризобии с использованием фермента нитрогеназы могут восстанавливать молекулярный азот (N_2) до аммиака (глава 23). Для того, чтобы разорвать тройную связь между двумя атомами азота, требуется много энергии и поэтому экспрессия нитрогеназы строго регулируется на нескольких уровнях. Большинство свободноживущих diaзотрофов мобилизуют аппарат нитрогеназы тогда, когда другие источники азота отсутствуют и создаются подходящие физико-химические условия для азотфиксации (Burris, Roberts, 1993). Ключевым среди этих условий является низкая концентрация кислорода, к которому нитрогеназа очень чувствительна. У бактерий существует ряд адаптивных механизмов, обеспечивающих понижение концентрации O_2 , необходимое для функционирования нитрогеназы (Robson, Postgate, 1980). Благодаря способности использовать N_2 в качестве единственного источника азота, свободноживущие diaзотрофы способны заселять ниши, недоступные для других организмов. Однако в отличие от свободноживущих diaзотрофов, ризобии, за исключением *Azorhizobium*, не могут использовать для роста только N_2 . Азотфиксация у ризобий связана с симбиотическим состоянием, когда бактерии, по-видимому, вообще не лимитированы по азоту (раздел III).

II.A.3. Ассимиляция аммония

Ризобии различаются по предпочтительности к различным источникам азота. Некоторые штаммы наилучшим образом растут на аммонии, в то время как другие в качестве единственного источника азота лучше используют глутамат или другие аминокислоты, и когда они растут на аминокислотах с высоким отношением N:C, в среде одновременно может существовать избыток аммония. У многих бактерий ассимиляция аммония при его высокой концентрации катализируется глутаматдегидрогеназой (GDH), в результате чего образуется глутамат. При низкой концентрации аммоний переходит сначала в глутамин, а затем в глутамат в ходе реакций, катализируемых глутаминсинтетазой (GS) и глутаматсинтазой (GOGAT). Реакции, катализируемые GS-GOGAT, по-видимому, являются основным путем ассимиляции аммония у ризобий. Особенностью ризобий является наличие нескольких разных GS (Espin et al., 1994). Две основные формы GSI и GSII имеют сходные свойства по отношению к субстрату и ингибиторам (Daglow, 1980) и обе формы часто находят в растущих культурах. Чтобы быстро оценить наличие этих белков, следует учитывать, что фракция, стабильная при нагревании, является GSI, а фракция лабильная при нагревании — GSII.

Белок GSI сходен с GS, найденными у других грамотрицательных бактерий (Rhee et al., 1985). Поведение GSI в ферментативных реакциях в присутствии Mn^{2+} и Mg^{2+} (Noguez et al., 1994; Arcondeguy et al., 1996) и регуляция GSI геном *glnB* (Amar et al., 1994), который кодирует PII-аденилтрансферазу, показывает, что GSI пост-трансляционно ингибируется в присутствии аммония. В отличие от энтеробактерий, у ризобий транскрипция гена *glnA* относительно независима от азотного статуса клеток или от белков NtrA и NtrC (Martin et al., 1988; de Bruijn et al., 1989; Shatters et al., 1989). Таким образом, ризобии содержат белок GSI при большинстве условий роста, хотя в

некоторых случаях GSI-специфическая активность может изменяться пост-трансляционно. Такая ситуация полезна для быстрого реагирования на изменение условий внешней среды, когда появляется потребность в глутаминсинтетазе, а синтез белков еще полностью не активировался - условий, которые могут быть характерными для пограничных почвенных зон.

В отличие от GSI, регуляция GSII, является в основном пост-транскрипционной, а не пост-трансляционной. Экспрессия GSII требует наличия белка NtrC, синтезируемого в ответ на азотный стресс и действующего совместно с NtrA, субъединицей РНК-полимеразы (Martin et al., 1988; de Bruijn et al., 1989; Shatters et al., 1989). Синтез и активность GSII обычно сильно подавляются в присутствии аммония. При этих условиях транскрипция GSII немедленно останавливается и активность GSII в культуре снижается, то есть соответствующий белок является нестабильным или специфически активируемым (Manco et al., 1992). Аминокислотная последовательность GSII сходна с последовательностью GS эукариот (Carlson, Chelm, 1986), однако присутствие GSII у ризобий может быть объяснено без привлечения гипотезы о переносе генов между про- и эукариотами (Shatters, Kahn, 1989; Pesole et al., 1995). Показано, что GSII является хорошим маркером для классификации штаммов ризобий (Taboada et al., 1996).

Третий фермент, GSIII не найден в свободноживущих культурах при нормальных лабораторных условиях, но он был определен у мутантов *S. meliloti*, которые лишены активностей GSI и GSII (Shatters et al., 1993), а у *R. phaseoli* охарактеризован как продукт гена, гомологичного *glnT Klebsiella pneumoniae* (Espin et al., 1990). Фермент из *S. meliloti* имел необычные кинетические свойства с очень высокими значениями K_m для глутамата (13.3 мМ) и аммония (33 мМ) (Shatters et al., 1993) и обладал низкой GS-трансферазной активностью. Значения K_m согласовывались с потребностью в аммонии и глутамате или аспартате для глутамин-независимого роста двойного мутанта *S. meliloti* (Somerville et al., 1989). Так как GSIII у двойного мутанта *S. meliloti* составлял около 4% водорастворимых белков, мутант, вероятно, синтезировал достаточное количество глутамина, чтобы поддержать рост, несмотря на низкое сродство к субстрату. Функции GS ферментов в отношении симбиоза еще неизвестны (раздел III).

У ризобий существует три потенциальных пути для синтеза глутамата: катализируемые GS-GOGAT (с использованием глутамина как окислителя и α -кетоглутарата в качестве субстрата), при помощи GDH (с использованием аммония как окислителя и α -кетоглутарата) и путь с трансаминацией α -кетоглутарата. Как NAD, так и NADP-зависимые формы GOGAT найдены у *Azorhizobium caulinodans* (Donald, Ludwig, 1984). Мутанты, продуцирующие только один из этих ферментов, неспособны расти на аммонии. У штамма 102F34 *S. meliloti* клонирован ген, кодирующий NADP-зависимый GOGAT и сконструирован транспозоновый мутант, дефицитный по этому ферменту (Lewis et al., 1990). Мутант не способен расти на среде, содержащей 10 мМ аммония, и плохо растет, когда аминокислоты используются в качестве единственного источника азота. Был получен набор ревертантов, у которых частично восстановлена способность к росту на некоторых аминокислотах, но не к росту на аммонии. Таким образом, у изучаемого штамма отсутствует аминокислотная дегидрогеназа, способная ассимилировать азот и переводить его в анаэробный пул. У *S. meliloti* 102F34 при росте на высокой концентрации аммония количество GDH возрастает примерно в 10 раз (Gonzales-Gonzales et al., 1990), но высокая концентрация фермента не является оптимальной для биосинтеза.

Находясь в составе глутамата, азот при помощи различных аминотрансфераз может переходить в другие аминокислоты. Основная аспаратаминотрансфераза ААТ-А в качестве акцептора азота из глутамата использует только оксалоацетат (Bai, Kahn, unpublished). У *S. meliloti* (штамм JJs10) ААТ-А индуцируется при росте на аспартате в качестве источника углерода (Rastogi, Watson, 1991), и следовательно катаболизм аспартата начинается с трансаминирования. Ген аспаратаминотрансферазы *aatB* также найден у *S. meliloti* (Alfano, Kahn, 1993). Он кодирует фермент с более высокой специфической активностью, чем ААТ-А, но никакого изменения фенотипа у мутанта *aatB* зарегистрировано не было. Основная, расщепляющая цепочку аминотрансфераза также присутствует у *S. meliloti* (Gonzales-Gonzales et al., 1990) и ген, кодирующий этот фермент, был клонирован (Alfano, Kahn, 1993).

II.A.4. Метаболизм аминокислот и нуклеотидов

Проведенные исследования метаболизма аминокислот и нуклеотидов указывают на то, что биосинтез большинства из них происходят по обычным путям. Работы в этой области помогают понять роль метаболизма аминокислот и нуклеотидов в симбиозе (раздел III).

II.B. РЕГУЛЯЦИЯ АЗОТНОГО МЕТАБОЛИЗМА

У энтеробактерий, таких как *E. coli* и *K. pneumoniae*, азотный метаболизм регулируется через центральную Ntr-систему (Magasanik, 1993). Три гена *ntrA*, *ntrB* и *ntrC* ответственны за общую азотную регуляцию, причем белки NtrB и NtrC составляют двухкомпонентную регуляторную систему, которая обеспечивает азотный статус клетки. При низком содержании азота сенсорный белок NtrB фосфорилируется и в таком состоянии активирует NtrC, который в свою очередь активирует транскрипцию ряда генов, участвующих в азотном метаболизме, за счет наличия ДНК-связывающего домена (Hirschman et al., 1985; Hunt, Magasanik, 1985; Ames, Nicado, 1985; Kustu et al., 1991; Magasanik, 1993). Белок NtrA, кодирующий сигма-54 фактор РНК-полимеразы, взаимодействует с белком NtrC для того, чтобы активировать транскрипцию генов (Hirschman et al., 1985; Hunt, Magasanik, 1985; Merrick, Gibbons, 1985). Гены, которые находятся под контролем Ntr, кодируют глутаминсинтетазу (GS), нитратредуктазу (NR), переносчик аммония (Amt), а также поступление и утилизацию аминокислот (Magasanik, 1993). Гены азотфиксации (*nif*) у *K. pneumoniae* также находятся под контролем Ntr-системы, которая активирует синтез белка NifA, индуцирующего транскрипцию других *nif*-генов (Ausubel, 1984; Cussin et al., 1986).

Система Ntr также регулирует азотный метаболизм у ризобий: у них идентифицированы гомологи *ntrA*, *ntrB* и *ntrC* и показано, что *ntrA* и *ntrC* необходимы для экспрессии ряда генов, участвующих в ассимиляции азота (Ausubel et al., 1985; Nixon et al., 1986; Pawlowski et al., 1987; Ronson et al., 1987; Szeto et al., 1987; Martin et al., 1988; Shatters et al., 1989; Stanley et al., 1989; Udvardi et al., 1992). Однако в схеме Ntr-контроля существует различие между ризобиями и энтеробактериями. В то время как ген *glnA* у энтеробактерий находится под контролем Ntr-системы (Magasanik, 1993), его гомологи у штаммов *Azorhizobium* и *Bradyrhizobium* не зависят от нее (Pawlowski et al., 1987; Carlson et al., 1987). Транскрипция *nif*-генов полностью зависит от NtrC у *K. pneumoniae*, но не зависит у *Rhizobium*, *Azorhizobium* и *Bradyrhizobium*, по крайней мере, в условиях симбиоза (Szeto et al., 1987; Pawlowski et al., 1987; Udvardi et al., 1992). Кроме того, белок NtrC не является необходимым для утилизации аминокислот у ризобий (Szeto et al., 1987; Pawlowski et al., 1987; Marti et al., 1988; Udvardi et al., 1992).

Регуляция *nif*-генов у ризобий представляет важное различие между этим бактериями и другими азотфиксаторами. По-видимому, низкая концентрация кислорода, а не дефицит азота, является основным сигналом, который включает азотфиксацию у ризобий (раздел III).

II.C. МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕРОДА

Ризобии могут использовать для биосинтеза и получения энергии широкий спектр углеродсодержащих соединений, но некоторые из них не могут быть метаболизированы из-за отсутствия ключевых ферментов.

II.C.1. C-1, C-2, C-3 соединения

Многие ризобии, включая *Bradyrhizobium japonicum*, *S. meliloti* и *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *trifolii*, *phaseoli* имеют абсолютную потребность в CO₂, предположительно для анаэробического метаболизма (Lowe, Evans, 1962). Однако штаммы *B. japonicum*, которые обладают гидрогеназой, могут утилизировать CO₂ в качестве единственного источника углерода с помощью цикла Кальвина (Simpson et al., 1979; Lepo et al., 1980; Tabita, 1988). Штаммы *B. japonicum* также могут использовать цикл Кальвина для роста на формиате после того, как с помощью формиатдегидрогеназы выделяется CO₂ (Manian, O'Gara, 1982). Рибулезобифосфаткарбоксилаза и фосфорибулекиназа, являющиеся

ключевыми ферментами цикла Кальвина, были найдены у *B. japonicum*, но не у *R. leguminosarum* bv. *viceae* и *trifolii* (Malik, Schlegel, 1981).

Метаболизм С-2 соединений (ацетата) важен потому, что ацетил-СоА является предшественником ряда анаболических реакций и служит для получения энергии. Ацетил-СоА необходим для работы цикла трикарбоновых кислот (ТСА) и является предшественником для поли-β-гидроксibuтиратного цикла, который у многих штаммов играет важную роль при симбиозе (раздел III). У *E. coli* рост на ацетате или жирных кислотах индуцирует глиоксилатный путь (Clark, Cronan, 1996). Эта последовательность реакций выполняет анаплеротическую функцию, которая заключается в том, что изоцитрат отводится из ТСА цикла и предотвращается потеря углерода в виде CO_2 . Ферменты, участвующие в глиоксилатном пути, включают изоцитратлиазу и малатсинтетазу. Конститутивная малатсинтетаза найдена у *S. meliloti* и *R. leguminosarum* (bv. *viceae*, *trifolii*, *phaseoli*). Изоцитратлиаза не экспрессируется в клетках, растущих на С-3, С-4 и С-6 источниках углерода (Johnson et al., 1966), но становится индуцибельной при росте на олеате, который метаболизируется путем β-окисления, что приводит к образованию ацетил-СоА. Показано (Dunkan, Fraenkel, 1979), что изоцитратлиаза индуцируется, когда *S. meliloti* растет на ацетате. Малатсинтетаза у *B. japonicum* является конститутивной, но этот вид ризобий не растет на олеате (Johnson et al., 1966).

Ризобии обычно плохо растут на ацетате (Johnson et al., 1966; Preston et al., 1989; Perez-Galdona, Kahn, 1994) и подвержены влиянию pH (Perez-Galdona, Kahn, 1994). У *B. japonicum* ацетат может быть активирован через ацетаткиназный-фосфотрансацетилазный путь (Smith et al., 1994) или ацетил-СоА-синтетазой (Preston et al., 1989). Наиболее высокий уровень ацетил-СоА-синтетазы и ацетаткиназы найден в клетках, растущих на ацетате или пирувате (Preston et al., 1989). Мутант *S. meliloti ackA* может расти на ацетате и ацетил-СоА-синтетазная активность регистрировалась как у штамма *S. meliloti* "дикого типа" так и у мутанта по гену *ackA*. Однако активность ацетил-СоА-синтетазы низка у клеток, растущих на минимальной среде с маннитолом, и рост исходного штамма на ацетате не приводил к повышению уровня этого фермента. Интересно, что у *S. meliloti* ген *ackA* индуцируется фосфатным стрессом, но не при росте на ацетате (Summers, McDermott, unpublished data).

У *B. japonicum* выявлена альдегиддегидрогеназа (Preston, LaRue, 1982), которая активна с набором различных субстратов и имеет K_{ms} от 4.0 мкМ для бутиральдегида до 454 мкМ для ацетальдегида.

Глицерин утилизируется в качестве единственного источника углерода рядом ризобий при помощи индуцибельных ферментов (Arias, Martinez-Drets, 1976; Glenn, Dilworth, 1981a). У *B. japonicum* и *R. leguminosarum* bv. *trifolii* метаболизм глицерина иницируется глицеролкиназой, которая продуцирует глицеролфосфат, конвертируемый в дигидроксиацетонфосфат при помощи глицеролфосфатдегидрогеназы. Дигидроксиацетон затем метаболизируется до пирувата, который может поступать в цикл трикарбоновых кислот.

Малонат также индуцирует некоторые ферменты, необходимые для его метаболизма у *R. leguminosarum* bv. *viceae* (Glenn, Dilworth, 1981a). Малонамидазы, которые могут играть роль в метаболизме азота в бактериоидах, очищены, гомогенизированы и охарактеризованы у *B. japonicum*. Эти ферменты, также как малонил-СоА-синтетаза, конститутивно экспрессируются у *B. japonicum* (Kim, Chae, 1990).

II.C.2. С-4 соединения

Метаболизму фумарата, сукцината и малата уделяется значительное внимание. Ризобии получают эти соединения через систему высокоэффективного С-4-дикарбоксилатного транспорта, кодируемую *dctA*-генами (Ronson et al., 1984; Bolton et al., 1986; Engelke et al., 1989). Белок DctA у различных ризобий имеет K_m 2-15 мкМ и V_{max} 10-80 нМ/мин/мг белка (Finan et al., 1981; McAllister, Lepo, 1983; SanFrancisco, Jacobson, 1985; Udvardi, et al., 1988a; Engelke et al., 1989). Транскрипция гена *dctA* индуцируется С-4-дикарбоксилатами через двухкомпонентную регуляторную систему, содержащую белки DctB и DctC (Jording et al., 1992, 1994). Система дикарбоксилатного транспорта также переносит аспартат (Watson et al., 1993) и может индуцироваться этим соединением (Batista et al., 1992).

Фумарат, сукцинат и малат являются промежуточными продуктами ТСА цикла, и таким образом их метаболизм происходит через этот цикл. Однако рост на С-4-дикарбоксилатах в качестве единственного источника углерода требует анаплеротического метаболизма для того, чтобы обеспечить ацетил-СоА для реакции конденсации с оксалоацетатом, а также для синтеза фосфоенолпирувата (PEP) для глюконеогенеза. Метаболический путь, который обеспечивает появление ацетил-СоА у *R. leguminosarum* bv. *viciae*, включает малатный фермент, пируватдегидрогеназу и PEP, который образуется из оксалоацетата через PEP-карбоксикиназу (McKay et al., 1985, 1988). PEP-карбоксикиназа требуется для глюконеогенеза у штамма ризобий NGR234, образующего симбиоз с широким спектром растений-хозяев (Osteras et al., 1991), и для роста некоторых мутантов *S. meliloti*, которые не могли потреблять сукцинат, так как были дефектны по глюконеогенезу. Один из этих мутантов был дефектен по PEP-карбоксикиназе, однако он мог медленно расти на сукцинате. Это указывает на то, что либо мутант содержал нерегистрируемое количество PEP-карбоксикиназы, либо он имел альтернативный путь, состоящий из малатдегидрогеназы (ME) и PEP-синтазы, который способен производить PEP. Два фермента ME были определены у *R. leguminosarum* bv. *viciae* (McKay et al., 1988) и у *S. meliloti* (Driscoll, Finan, 1993). Один из ME у *S. meliloti* специфично использовал NADP^+ в качестве кофактора, в то время как другой мог использовать NADP^+ и NAD^+ , но последний имел преимущество. Мутанты NAD^+ -ME не имели видимого дефекта по использованию углерода, и таким образом оба ME экспрессировались в свободном состоянии. Однако мутант NAD^+ -ME при симбиозе имел фенотип Fix^- (Driscoll, Finan, 1993) (раздел III).

II.C.3. C-5 соединения

Метаболизм арабинозы у *S. meliloti*, *R. leguminosarum* (bv. *viciae*, *trifolii*, *phaseoli*) происходит через 2-оксоглутарат-полуальдегид, 2-оксоглутарат и цикл ТСА (Duncan, Fraenkel, 1979; Dilworth et al., 1986). Клеточный уровень некоторых ферментов, участвующих в метаболизме арабинозы, координировано возрастает при росте на арабинозе (Dilworth et al., 1986). Покоящиеся клетки мутанта *S. meliloti* по 2-оксоглутаратдегидрогеназе способны метаболизировать арабинозу до CO_2 , указывая на альтернативный путь ее метаболизма. Возможный путь заключается в конверсии 2-оксоглутарата до глутамата, который может перезапустить ТСА цикл через γ -аминобутират (GABA), отводя или конвертируя 2-оксоглутарат в пируват и ацетальдегид через 2-кето-3-дезоксид-арабинон-альдозу (KDA-альдозу). Низкий уровень KDA-альдозы найден у *S. meliloti* и *R. leguminosarum* bv. *viciae*, но не у *R. leguminosarum* bv. *trifolii* и *phaseoli* (Duncan, 1979). Метаболизм арабинозы у *B. japonicum* происходит главным образом через KDA-альдозу (Pedrosa, Zancan, 1974), но ферменты метаболизма GABA были также найдены у *B. japonicum*, *Bradyrhizobium* sp. (вигна) (Duncan, 1979) и у быстрорастущих ризобий вигны (Jin et al., 1990).

Метаболизм рибозы инициируется рибокиназой с образованием рибозо-5-фосфата, который затем может прямо подаваться в биосинтез нуклеотидов или изомеризоваться до рибулозо-5-фосфата, а затем эпимеризоваться в ксилулозо-5-фосфат (Dilworth et al., 1986). Рибулозо-5-фосфат и ксилулозо-5-фосфат конвертируются в фруктозо-6-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат через транс-кетотазу и трансальдозу. Фруктозо-6-фосфат затем изомеризуется в глюкозо-6-фосфат (Martinez De Drets, Arias, 1970), начиная путь Энтнера-Дудорова, а глицеральдегид-3-фосфат может метаболизироваться до пирувата. Метаболизм рибозы у *S. meliloti*, по-видимому, не ограничивается приведенными сценариями: у мутантов *S. meliloti*, не имеющих рибокиназы, возможен метаболизм рибозы. Свойства мутантов *S. meliloti*, не имеющих ксилулоизомеразы, аналогичны (Duncan, 1981).

II.C.4. C-6 соединения

Ферменты пути Энтнера-Дудорова были обнаружены у *B. japonicum* (Katzenelson, Zagallo, 1957; Keele et al., 1969; Martinez De Drets, Arias, 1972), *Bradyrhizobium* sp. (люпин) (Martinez De Drets, Arias, 1972), *Bradyrhizobium* sp. (вигна) (Martinez De Drets, Arias, 1972), медленно растущих ризобий из *Desmodium* (Martinez De Drets, Arias, 1972), *S. meliloti* (Martinez De Drets, Arias, 1972; Irigoyen et al., 1990), *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *trifolii* и *phaseoli* (Martinez De Drets, Arias, 1972; Glenn et al., 1984), *R. tropici* (Romanov et al., 1994) и быстрорастущих ризобий из *Lotus* (Martinez

ден у *Bradyrhizobium* и некоторых штаммов *Rhizobium* (Mulangoy, Elkan, 1977; Stowers, Elkan, 1983). Однако в целом путь EMP не является основным в С-метаболизме.

Окислительный пентозофосфатный цикл был найден у быстрорастущих ризобий, включая *R. tropici* (Romanov et al., 1994), *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Martinez De Drets, Arias, 1972; Glenn et al., 1984), bv. *trifolii* (Martinez De Drets, Arias, 1972; Ronson, Primrose, 1979) и bv. *phaseoli* (Martinez De Drets, Arias, 1972). Глюконат-6-фосфатдегидрогеназа отсутствует у брадиризобий сои, люпина, вигны и *Desmodium* (Martinez De Drets, Arias, 1972; Mulangoy, Elkan, 1977; Stowers, Elkan, 1983) и поэтому пентозофосфатный цикл, по-видимому, не характерен для медленно растущих штаммов. Однако трансальдолаза и транскетолаза определялись у *B. japonicum* (Mulangoy, Elkan, 1977) и у *Bradyrhizobium* (вигна) (Stowers, Elkan, 1983), которые имеют механизм для генерации предшественников синтеза нуклеотидов.

II.C.5. Дисахариды

Сравнительное изучение ризобий показало существование различий между быстрорастущими и медленно растущими формами по способности утилизировать дисахариды. Сахароза, лактоза и мальтоза плохо потребляются медленно растущими штаммами люпина и вигны (Glenn, Dilworth, 1981b), которые имеют низкий уровень транспорта дисахаридов (Martinez De Drets, 1974; Glenn, Dilworth, 1981b). Напротив, *S. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *trifolii* и быстрорастущие изоляты из вигны, бобов и *Lotus* на этих дисахаридах росли хорошо (Martinez De Drets, 1974; Glenn, Dilworth, 1981b). Поглощение сахарозы и мальтозы является конститутивным у *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *trifolii*, но индуцируется 10-20-кратно сахарозой у *S. meliloti* и быстрорастущих изолятов вигны (Glenn, Dilworth, 1981b). Транспорт лактозы в штаммы *R. leguminosarum* связан с лактозоиндуцибельной пермеазой.

Штамм *S. meliloti* Rm2011 имеет две разделяющиеся β-галактозидазы (Niel et al., 1977), одна из которых экспрессируется конститутивно при низком уровне, а другая индуцируется лактозой. У этого штамма индуцибельная β-галактозидаза требуется для роста на лактозе (Charles et al., 1990). Ген, кодирующий этот фермент, локализован на мегаплазмиде pRmeSU47b (Charles, Finan, 1990, 1991) и недавно был охарактеризован (Jelesko, Leigh, 1994). Утилизация маннозы и лактозы у *S. meliloti* ингибируется в присутствии сукцината (Ucker, Signer, 1978; Arias et al., 1982; Jelesko, Leigh, 1994).

II.C.6. Ароматические соединения

Для бактерий основным путем деградации ароматических соединений является β-кетoadипатный путь. Различные ароматические субстраты преобразуются в протокатехат или катехол, которые включаются в пути дальнейшей деградации по мета- и орто-путям. Орто-путь ведет к превращению протокатехата и катехола в β-кетoadипат и в конечном счете в сукцинат и ацетил-CoA (Stanier, Ornston, 1973), которые могут в дальнейшем окисляться в цикле TCA.

Многие ризобии способны расти на ароматических соединениях (Hussein et al., 1974; Parke, Ornston, 1984). Показано, что у всех биотипов *R. leguminosarum* *p*-гидроксibenзоат метаболизируется в протокатехат (Muthukumar et al., 1982). Проведена серия экспериментов по изучению метаболизма ароматических соединений у *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Glenn, Dilworth, 1981a). Исследуемые соединения включали фенол, бензоат, *p*-гидроксibenзоат, катехол, протокатехат, салицилат и ряд гидрокси- и метокси-замещенных бензоатов. Некоторые из перечисленных соединений окислялись немедленно, тогда как утилизация других характеризовалась наличием продолжительной лаг-фазы (Glenn, Dilworth, 1981a; Rohm, Weiner, 1985). Большинство ферментов этого пути у штаммов *Bradyrhizobium* экспрессируется конститутивно (Parke, Ornston, 1986), но являются индуцибельными у *Rhizobium* (Hussein et al., 1974; Muthukumar et al., 1982; Chen et al., 1984a; Parke, Ornston, 1986; Gajendiran, Mahadevan, 1988; Wong et al., 1991). Один из штаммов *R. leguminosarum* bv. *trifolii* обладает катехольной и протокатехатной ветвями β-кетoadипатного пути, тогда как другие штаммы bv. *trifolii* используют только протокатехатную ветвь (Chen et al., 1984b). Были клонированы гены *B. japonicum*, кодирующие протокатехат-3,4-диоксигеназу (Podila et al.,

1993), а также охарактеризован ген *R. leguminosarum* bv. *viceae*, кодирующий 4-гидроксibenзоат-гидроксилазу (Wong et al., 1994).

III. Интеграция метаболизма бактериоидов и растительных клеток в клубеньках

“Когда живая клетка растения должна сосуществовать с другим организмом, фактически являющимся частью ее протоплазмы, необходимо наличие тонкого баланса между ростом растения и бактерий”
Бейеринк, 1888

Фиксирующие азот формы ризобий (бактериоиды) в клубеньках бобовых растений находятся в цитоплазме хозяйских клеток. Тем не менее, подобно многим другим эндосимбионтам, они отделены от цитоплазмы *per se* производимой растением симбиосомной (перибактероидной) мембраной (РВМ). РВМ играет важную роль в обмене питательными веществами между растением и бактериоидами, обеспечивая метаболическую связь партнеров (Udvardi, Day, 1997).

Изучение бактериоидов внесло большой вклад в понимание того, как осуществляется интеграция растительного и бактериального метаболизма при симбиозе. Адаптация ризобий к симбиотической нише требует активации лишь ограниченного набора метаболических путей и репрессии остальных путей. Условия, определяемые растением, играют главную роль в биохимических изменениях, происходящих в процессе дифференцировки бактериоидов. При развитии клубеньков растительный метаболизм также подвергается специализации, и ясно, что бактериоиды играют в этом важную роль. Поскольку обмен восстановленным растением углеродом и восстановленным в бактериоидах азотом является основой симбиотических отношений, их понимание требует анализа углеродного метаболизма растения и бактериоидов в клубеньках, а также метаболизма азота в растениях.

III.A. СОЗДАНИЕ В КЛУБЕНЬКАХ МИКРОАЭРОБНЫХ УСЛОВИЙ, НЕОБХОДИМЫХ ДЛЯ АЗОТФИКСАЦИИ

Развитие клубеньков и их ультраструктура детально описаны в главе 18. У бобовых существует два типа клубеньков: детерминированные и недетерминированные. Детерминированные клубеньки обычно сферические и имеют слой неинфицированных клеток, окружающих центральную область, в которой клетки инфицированы бактериоидами. Недетерминированные клубеньки обычно цилиндрические (часто разветвленные) и, подобно детерминированным клубенькам, имеют слой неинфицированных клеток, который окружает внутреннее ядро инфицированных клеток. Внешний слой неинфицированных клеток в клубеньках обоих типов ограничивает поток O_2 (и других газов) в зону инфекции и содержит периферическую сосудистую систему, через которую происходит обмен питательными веществами с растением. Устойчивость к диффузии O_2 вместе с высокой скоростью его потребления бактериоидами и митохондриями приводит к установлению внутри инфицированных клеток микроаэробных условий. Леггемоглобин – кислород-связывающий белок, обнаруживаемый в миллимолярных концентрациях в растительной цитоплазме (Appleby, 1992), усиливает транспорт O_2 через цитоплазму путем увеличения его количества без повышения количества свободного O_2 . Низкая концентрация кислорода необходима для азотфиксации, так как нитрогеназа крайне чувствительна к O_2 . Леггемоглобин также ослабляет колебания концентрации O_2 , происходящие в результате изменения проницаемости диффузионного барьера или скорости дыхания. Тем не менее, низкая концентрация O_2 сдерживает окислительный метаболизм и низкий уровень кислорода – главный регулятор метаболизма растительных клеток и бактериоидов в клубеньках.

III.B. МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕРОДА В РАСТЕНИЯХ

Установлено, что для симбиотической фиксации 1 грамма N_2 необходимо 5–10 граммов углерода (Phillips, 1980). Он расходуется в качестве источника энергии и восстановителей для фиксации N_2 , углеродных скелетов для ассимиляции фиксированного N_2 в аминокислоты, а также

для роста и поддержания в активном состоянии клубеньков и бактериоидов. Исследования с метками показали, что первичным фотосинтатом, перемещаемым в клубеньки, является сахароза (Reibach, Streeter, 1983; Kouchi, Nakaji, 1985; Gordon et al., 1985). Она метаболизируется в основном в растительной цитоплазме зоны инфекции клубенька, под действием сахарозосинтазы и гликолитических ферментов (Day, Copeland, 1991). Инвертаза и сахарозосинтаза присутствуют в больших количествах в клубеньках сои (Streeter, 1982; Kouchi et al., 1988; Copeland et al., 1989b) и количество сахарозосинтазы коррелирует с уровнем нитрогеназной активности (Anthon, Emerich, 1990). Система гликолитических ферментов, находящаяся в цитозоле растения-хозяина (Reibach, Streeter, 1983; Copeland et al., 1989b; Hong, Copeland, 1990), предполагает высокую активность превращения гексоз в триозы, и это согласуется с данными, показывающими быструю конверсию сахарозы в органические кислоты (обсуждается ниже). Их синтез вряд ли является результатом активности цикла ТСА растения-хозяина, так как дыхание митохондрий лимитировано низкой концентрацией кислорода в клубеньках (Rawsthorne, LaRue, 1986). Более того, активность ферментов цикла ТСА в цитозоле клубеньков низка и может лимитировать катаболизм по данному метаболическому пути. Например, в клубеньках сои не обнаружено 2-оксоглутаратдегидрогеназной и пируватдегидрогеназной активностей и найден лишь низкий уровень изоцитратдегидрогеназы (Suganuma, Yamamoto, 1987).

Показано, что триозы метаболизируются через фосфоенолпируват (PEP) карбоксилазу и малатдегидрогеназу: по сравнению с корнями, уровень PEP карбоксилазы в клубеньках гороха, кормовых бобов и люпина высок (Lawrie, Wheeler, 1975; Christeller et al., 1977; DeVries et al., 1980) и исследования с $^{14}\text{CO}_2$ -меткой и интактными клубеньками показали очень быстрое, и в больших количествах, появление $^{14}\text{CO}_2$ в органических кислотах — особенно в малате (Christeller et al., 1977; Coker, Shubert, 1981; Vance et al., 1983; Snapp, Vance, 1986). Высокий уровень малатдегидрогеназы, обнаруживаемый во фракции цитозоля клубеньков, также согласуется с интеграцией $^{14}\text{CO}_2$ в состав малата (Lawrie, Wheeler, 1975; Christeller et al., 1977; DeVries et al., 1980). Таким образом, фотосинтаты переносятся к клубенькам в форме сахарозы, большая часть которой метаболизируется до малата через PEP и оксалоацетат.

В дополнение к сахарозе и глюкозе, в клубеньках сои выявлены *myo*-инозитол, (+)-*chiro*-инозитол, α,α -трегалоза и (+)-пинитол, концентрации которых часто превосходит концентрацию сахарозы (Streeter, Bosler, 1976; Streeter, 1987). Мальтоза также обнаружена в клубеньках сои, и ее количество, как и количества *myo*-инозитола и *chiro*-инозитола, возрастает с началом азотфиксации (Streeter, 1980).

Так как концентрация кислорода в клубеньках очень низка, неудивительно, что в них могут быть обнаружены ферментационно-подобные пути. GABA, который обычно накапливается в культурах растительных тканей при инкубации в анаэробных условиях, обнаружен в сравнительном избытке в клубеньках клевера (Butler, Bathurst, 1958; Freney, Gibson, 1975), люцерны (Larher et al., 1983; Jin et al., 1990) и сои (Streeter, 1987). Ацетальдегид и этанол являются летучими выделениями клубеньков сои (Van Straten, Schmidt, 1974) и, наряду с нитрогеназой, в клубеньках обнаруживаются пируватдекарбоксилазу и алкогольдегидрогеназу (Tajima, LaRue, 1982). Концентрации таких соединений малы по сравнению с сахарами и органическими кислотами (Streeter, 1987), но их наличие, как и накопление других частично метаболизированных соединений (например малата и сукцината), показывает, что растение не способно к полному окислению всего углерода, поставляемого в клубеньки.

Подводя итог, можно сказать, что в растительной фракции клубеньков присутствует много различных углеродных соединений, и их относительные концентрации изменяются в процессе развития. Основные исследования были сфокусированы на выяснении того, какие из этих соединений используются для поддержания азотфиксации.

III.C. МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕРОДА В КЛУБЕНЬКАХ

III.C.1. Какие соединения углерода поступают в бактериоиды при азотфиксации?

Сахара. Как было отмечено ранее, у *Bradyrhizobium* отсутствует инвертаза, и сахароза не используется этими бактериями в качестве источника энергии. Даже для тех ризобий, которые

способны к гидролизу сахарозы, показано, что ни сахароза, ни гексозы, получаемые в результате ее гидролиза, не являются непосредственными источниками энергии для бактериоидов. Поглощение и метаболизм сахарозы, глюкозы или фруктозы изолированными бактериоидами минимальны (Glenn, Dilworth, 1981b; Reibach, Streeter, 1983; Salminen, Streeter, 1987a; Copeland et al., 1989a). То, что ферменты метаболизма сахаров, индуцируемые в клетках свободноживущих ризобий, в бактериоидах отсутствуют, означает, что бактериоиды подвергаются воздействию лишь очень малых концентраций этих сахаров (Saraso et al., 1986; McKay et al., 1988). Более того, мутанты *S. meliloti* (Cervenansky, Arias, 1984; El Guezar et al., 1988; Hornez et al., 1994), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Ronson, Primrose, 1979) и bv. *viciae* (Glenn et al., 1984; Dilworth et al., 1986) с различными дефектами в транспорте или метаболизме сахаров, имели фенотип Fix^+ . Прямое измерение скорости транспорта сахаров через РВМ сои показало, что она относительно непроницаема для этих веществ (Udvardi et al., 1990). Эти результаты согласуются с тем, что растение не способно снабжать бактериоиды сахарозой, глюкозой или фруктозой в значительных количествах. Единственным исключением являются французские бобы, у которых глюкоза транспортируется через РВМ с заметной скоростью и стимулирует нитрогеназную активность изолированных бактериоидов (Trinchant et al., 1981; Herrada et al., 1989). Анализ гликолитических ферментов у бактериоидов *R. tropici*, выделенных из клубеньков фасоли, показало, что они сходны со свободноживущими клетками, культивируемыми на сахарозе (Romanov et al., 1994).

Циклитолы концентрируются преимущественно в инфицированных тканях и обнаружены в значительных количествах в бактериоидах гороха (Skot, Egsgaard, 1984), люцерны (Fougere et al., 1991) и сои (Streeter, 1987). Начальные стадии метаболизма *myo*-инозитола для *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Poole et al., 1994) аналогичны *Klebsiella aerogenes* (Berman, Magasanik, 1966a, 1966b; Anderson, Magasanik 1971a, 1971b). Потребление *myo*-инозитола конститутивно и его катаболизм инициируется *myo*-инозитолдегидрогеназой, за которой следует 2-кето-*myo*-инозитолдегидратаза; оба фермента индуцируются при росте на *myo*-инозитоле (Poole et al., 1994). Последовательность катаболизма *myo*-инозитола требует дальнейшей характеристики, и уже получены мутанты *R. leguminosarum* bv. *viciae*, не способные использовать его в качестве единственного источника углерода и являющиеся Nod^+ и Fix^+ (Poole et al., 1994).

Дикарбоновые кислоты. В противоположность сахарам, C-4-дикарбоновые кислоты представляются необходимыми для фиксации азота бактериоидами. Существует четыре группы фактов, которые указывают на важность сукцината и/или малата как основных субстратов:

1) $^{14}\text{CO}_2$, поставляемый бобовым растениям, быстро аккумулируется в органических кислотах цитозольной фракции клубеньков (Streeter, 1987);

2) РВМ является переносчиком дикарбоксилатов, обеспечивающим их быстрый транспорт из цитозоля клубеньков в бактериоиды (Udvardi et al., 1988a; Herrada et al., 1989);

3) C-4-дикарбоновые кислоты поглощаются бактериоидами (San Francisco, Jacobson, 1985; Kouchi et al., 1988; Udvardi et al., 1988a) со скоростью, в 30–50 раз большей, чем сахара (Salminen, Streeter, 1987b), и быстро окисляются до CO_2 (Stovall, Cole, 1978; Salminen, Streeter, 1987a). C-4-дикарбоксилаты также являются эффективными субстратами для азотфиксации (Bergersen, Turner, 1967; Bergersen, 1977; Peterson, LaRue, 1982; Miller et al., 1988);

4) Мутанты ризобий с ослабленной способностью к транспорту C-4-дикарбоновых кислот формируют неэффективные клубеньки (Ronson et al., 1981; Finan et al., 1983; Bolton et al., 1986; Watson et al., 1988; El Din, 1992). Все мутанты *S. meliloti* с дефектами синтеза ферментов цикла ТСА, таких как цитратсинтаза (Mortimer, McDermott, Kahn, unpublished), изоцитратдегидрогеназа (McDermott, Kahn, 1992), α -кетоглутаратдегидрогеназа (Duncan, Fraenkel, 1979) и сукцинатдегидрогеназа (Gardioli et al., 1987) не способны к азотфиксации.

Как обсуждалось выше, для клеток, использующих C-4-дикарбоксилаты как единственный или основной источник восстановленного углерода, работа цикла ТСА требует анаэробического метаболизма для предоставления ацетил-СoА в качестве акцептора оксалоацетата. Возможны несколько путей от малата или оксалоацетата до пирувата с участием ферментов пируваткарбоксилазы, PEP-карбоксикиназы и малатдегидрогеназы. Мутанты *R. tropici*, *R. etli* (Dunn et al., 1996), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Ronson, Primrose, 1979) и bv. *viciae* (Arwas et al., 1986),

дефектные по пируваткарбоксилазе, имеют фенотип Fix^+ . PEP-карбоксикиназа в норме обнаруживается как компонент системы глюконеогенеза и индуцируется у *S. meliloti* при выращивании на сукцинате (Osteras et al., 1995). PEP-карбоксикиназа важна для углеродного метаболизма в процессе симбиотических отношений, но степень этой важности зависит от генотипа растения-хозяина. PEP-карбоксикиназный мутант *R. leguminosarum* bv. *viceae* был Fix^+ (McKay et al., 1985), тогда как симбиотическая активность PEP-карбоксикиназного мутанта штамма NGR234 варьировала при инокуляции *Leucaena leucocephala* и *Macroptilium atropurpureum*, а на корнях *Vigna unguiculata* он формировал только небольшое количество Fix^- клубеньков (Osteras et al., 1991). Возможно, что PEP-карбоксикиназа вовлечена в метаболизм углерода в процессе инфекции, а разная пригодность соединений углерода для растений-хозяев приводит к различным цепям событий (Osteras et al., 1995). Во-первых, PEP-карбоксикиназа не найдена в зрелых бактериоидах *S. meliloti* дикого типа (Finan et al., 1991). Во-вторых, ее низкий уровень обнаружен в зрелых бактериоидах гороха и она не была необходима для процессов клубенькообразования и фиксации азота (McKay et al., 1985). В-третьих, ультраструктурный анализ клубеньков в различных симбиозах, показал, что их развитие блокируется на разных стадиях (Osteras et al., 1991). В противоположность этому, активность PEP-карбоксикиназы в бактериоидах сои увеличивается параллельно нитрогеназной активности (Smith et al., 1994). Последние наблюдения не подтверждают, что PEP-карбоксикиназа играет главную роль в метаболизме бактериоидов сои, что не противоречит отмеченному выше.

У ризобий выявлены NAD- и NADP-зависимые малатные ферменты (NAD-ME, NADP-ME) (Kouchi et al., 1988; McKay et al., 1988; Copeland et al., 1989a; Osteras et al., 1991), оба эти фермента были частично очищены и охарактеризованы (Kimura, Tajima, 1989; Copeland et al., 1989a; Trinchant, Rigaud, 1990). NADP-ME *B. japonicum* имеет значительно более высокое сродство к малату ($K_m = 0.1 \text{ mM}$), чем NAD-ME ($K_m \sim 2.0 \text{ mM}$). Выделены мутанты *S. meliloti* по обоим ферментам и обнаружено, что только мутант, дефектный по NAD-ME, является симбиотически неактивным (Driscoll, Finan, 1993, 1996).

Аминокислоты. Существует предположение о том, что аминокислоты могут также играть роль в снабжении бактериоидов углеродом и/или энергией (Kahn et al., 1985, 1994). Ризобии способны расти на аминокислотах как единственных источниках углерода или азота, и такая катаболическая активность часто индуцирована в бактериоидах (Kahn et al., 1985; Duran, Calderon, 1995). Не обнаружено мутаций, влияющих только на катаболизм аминокислот и приводящих к неэффективному симбиозу, за исключением *dct* мутаций, влияющих на катаболизм аспартата и дикарбоксилатов. Глутамат и пролин способны усиливать дыхание и поддерживать азотфиксацию в изолированных бактериоидах (Bergersen, Turner, 1990b; Zhu et al., 1992), хотя это, по-видимому, выражается лишь в предварительном дезаминировании аминокислот (Bergersen, Turner, 1990b).

По мнению некоторых авторов, пролин может играть важную роль как источник углерода и энергии для поддержания азотфиксации (Kohl et al., 1988; Kohl et al., 1994). Хотя активность пролиндегидрогеназы и обнаружена в бактериоидах сои (Kohl et al., 1988), она была низка (~ 5 нмоль/мин/мг белка). Пролин поглощался интактными симбиосомами соевых бобов (Udvardi et al., 1991) и бактериоидами вигны (Glenn et al., 1991), но со значительно меньшей скоростью, чем дикарбоновые кислоты. Эксперименты с $^{14}\text{CO}_2$ -меткой показали, что относительно малое количество метки, введенной в интактные бактериоиды сои, обнаруживается в составе пролина (Salminen, Streeter, 1992), а в других опытах в пролине вообще не было обнаружено метки (Kouchi et al., 1991). Мутант *R. leguminosarum* bv. *viceae*, дефектный по катаболизму пролина (Chien et al., 1991), и пролиндегидрогеназный (*putA*) мутант *S. meliloti* (Jimenez-Zurdo et al., 1995) были Fix^+ . Хотя пролин, очевидно, не используется как основной источник углерода при N_2 -фиксации, *putA* мутант имеет сниженную конкурентоспособность (Jimenez-Zurdo et al., 1997). Опыты со слиянием *putA::lacZ* показывают, что пролин может быть востребован во время инфицирования растительных клеток. Во время стресса, вызываемого недостатком влаги, пролин может участвовать в установлении водного баланса между бактериоидами и растением-хозяином. Пролин обычно накапливается в бактериях при водном стрессе (Harris, 1981), а в цитозоле клубеньков и бактериоидах сои (Kohl et al., 1991) и клевера (Fougere et al., 1991) - при солевом стрессе.

GABA обнаруживается в относительном избытке в клубеньках клевера (Butler, Bathurst, 1958; Freney, Gibson, 1975), люцерны (Larher et al., 1983; Jin et al., 1990) и сои (Streeter, 1987). Существуют данные о том, что GABA не переносится от растения-хозяина в бактериоиды (Jin et al., 1990). Даже если распределение потока углерода через шунт GABA играет важную роль в метаболизме бактериоидов люцерны и сои, активность соответствующих ферментов обнаруживается в бактериоидах лишь на низком уровне (Freney, Gibson, 1975; Jin et al., 1990; Miller et al., 1991). Эта активность намного ниже, чем у быстрорастущих ризобий вигны, растущих на GABA как на единственном источнике C и N (Jin et al., 1990).

Другие источники углерода. Бактериоиды имеют по крайней мере некоторые ферменты, необходимые для метаболизма других углеродных соединений, которые могут производиться в клубеньках. Как говорилось выше, клубеньки некоторых бобовых продуцируют ацетальдегид и этанол (Van Straten, Schmidt, 1974), содержат пируватдекарбоксилазу (Tajima, LaRue, 1982) и алкогольдегидрогеназу (Tajima, LaRue, 1982; Saganuma, Yamamoto, 1987). Большое число альдегидов и спиртов повышает скорость восстановления ацетилена в изолированных клубеньках сои (Peterson, LaRue, 1981), а альдегиддегидрогеназа и алкогольдегидрогеназа присутствуют в бактериоидах (Wong et al., 1971; Triplett, Blevins, 1979; Peterson, LaRue, 1982). Выделенная из бактериоидов сои альдегиддегидрогеназа активна по отношению к некоторым субстратам, включая семиальдегид янтарной кислоты (Peterson, LaRue, 1982). Если субстратом является ацетальдегид, конечный ацетат может быть метаболизирован через превращение в CoA-эфир при помощи или ацетил-CoA-синтетазы, или комбинации ацетаткиназы и фосфотрансацетилазы. Все эти ферменты обнаружены в бактериоидах сои (Preston et al., 1989), и активность ферментов второго пути увеличивается параллельно ацетиленредуктазной активности (Smith et al., 1994), что предполагает утилизацию ацетата. Хотя изолированные бактериоиды люцерны способны использовать сукцинат, фумарат, малат и оксалоацетат для поддержания нитрогеназной активности, они не используют ацетат (Miller et al., 1988). Таким образом, значение ацетата как источника углерода для бактериоидов может варьировать для различных симбиозов.

Концентрация малоната в клубеньках также значительна (Stumpf, Burris, 1979; Kouchi, Yoneyama, 1986; Steeter, 1987) и малонил-CoA-синтетаза обнаруживается в бактериоидах сои (Kim, Chae, 1991). У *B. japonicum* были охарактеризованы три новые малонамидазы (Kim, Kang, 1994). Возможно, что поглощение малоната бактериоидами является частью "малонатного челнока", который функционирует для транспорта аммония из бактериоидов к растению-хозяину (Kim, Chae, 1990). Однако скорости поглощения малоната бактериоидами сои (Reibach, Streeter, 1984) и его транспорта через симбиосомную мембрану (Humbek, Werner, 1987; Ou Yang et al., 1990) низки. Кроме того, окисление малоната ингибируется сукцинатом (Werner et al., 1982).

Подводя итог, можно сказать, что C-4-дикарбоксилаты, особенно малат, являются главными источниками углерода, которыми растения снабжают бактериоиды в большинстве, если не во всех симбиозах. Тем не менее, растение предоставляет бактериям и другие соединения углерода, и их, количество и роль меняются в процессе развития клубеньков, а также варьируют в зависимости от типа симбиоза.

III.C.2. Регуляция цикла трикарбоновых кислот и переход углерода на другие метаболические пути

Так как C-4-дикарбоксилаты являются основным источником углерода, переходящего из растений в бактериоиды, важно понять принцип работы цикла трикарбоновых кислот (ТСА) в бактериоидах и установить пути/ферменты, которые участвуют в движении субстратов этого цикла. Несмотря на то, что значительная часть углерода окисляется через ТСА цикл до CO_2 , большая фракция не участвует в нем, по крайней мере немедленно. Предполагается, что уход углерода из ТСА цикла частично происходит из-за изменения активности его ферментов (McDermott et al., 1989). Такая регуляция может происходить на транскрипционном уровне как у *E. coli*, у которой гены, кодирующие ферменты ТСА цикла, репрессируются при переходе с аэробного на анаэробный рост (Lynch, Linn, 1996). Пост-трансляционная регуляция может быть важной при микроаэробных

условиях в клубеньках, когда высокое отношение NAD(P)H/NAD(P) ингибирует дегидрогеназу, а также изоцитратдегидрогеназу и 2-оксоглутаратдегидрогеназу (McDermott et al., 1989). Показано, что комплекс 2-оксоглутаратдегидрогеназы у свободноживущих клеток *B. japonicum* ингибируется, когда отношение NADH/NAD так же высоко, как и в бактериоидах (Tajima, Kouzai, 1989; Salminen, Streeter, 1990).

Переход углерода ТСА цикла в аминокислоты. При добавлении меченых субстратов к изолированным бактериоидам сои (Stovall, Cole, 1978) показано, что из $[1,4-^{14}\text{C}]$ -сукцината выделялось на 30% больше $^{14}\text{CO}_2$, чем из $[2,3-^{14}\text{C}]$ -сукцината. Это показывает, что в бактериоидах происходил полный ТСА цикл (Stovall, Cole, 1978). Однако количественные различия в выделении $^{14}\text{CO}_2$ из $[1,4-^{14}\text{C}]$ -сукцината и $[2,3-^{14}\text{C}]$ -сукцината указывают на то, что значительное количество углерода не окисляется полностью и выводится из ТСА цикла. В аналогичных исследованиях с бактериоидами в анаэробных условиях (Salminen, Streeter, 1987) показано, что в четыре раза большее количество $^{14}\text{CO}_2$, выделяемое бактериоидами, имело происхождение из $[1,4-^{14}\text{C}]$ -сукцината, чем из $[2,3-^{14}\text{C}]$ -сукцината, даже если количества этих субстратов были равны. Частично эта разница появляется из-за того, что метка $[2,3-^{14}\text{C}]$ -сукцината аккумулируется в глутамате, а $[1,4-^{14}\text{C}]$ -сукцинат превращается быстрее, чем $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -малат (Reibach, Streeter, 1984). Эти данные показывают, что дикарбоксилаты превращаются очень быстро, проходя ТСА цикл, но некоторая часть углерода выводится из ТСА цикла и переходит в глутамат (в меньшей степени в аспарат и аланин). В экстрактах бактериоидов выявлена активная аспартаза (Kouchi et al., 1991) и это может являться причиной различия между скоростями утилизации малата и сукцината (Salminen, Streeter, 1987b). То же самое показано для бактериоидов сои и гороха (Salminen, Streeter, 1992): большое количество метки выявилось в глутамате, хотя скорость ее аккумуляции в бактериоидах гороха ниже, чем в бактериоидах сои. Несмотря на это, мутанты *S. meliloti*, не имеющие активности GOGAT, являлись Fix^+ (Osburne, Signer, 1980; Lewis et al., 1990), а мутанты *B. japonicum*, дефектные по GOGAT, были Fix^- (O'Gara et al., 1984). Изменение интерконверсии глутамата и 2-оксоглутарата у *R. etli* путем введения гена GDH из *E. coli*, также ведет к появлению Fix^- фенотипа (Mendoza et al., 1995).

Помимо глутамата, другие аминокислоты также быстро синтезируются из дикарбоновых кислот клубеньков. При подаче $^{14}\text{CO}_2$ к интактным клубенькам метка устойчиво аккумулируется в аланине и аспарате бактериоидов (Salminen, Streeter, 1992), а в интактных симбиосомах гороха образуется $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -малат. Сообщалось, что добавление глутамата к инкубационной смеси вызывало 3-х кратное возрастание количества меченых аминокислот (Rosendahl et al., 1992), что может быть связано с усилением трансаминирования оксалоацетата или пирувата (Rosendahl et al., 1992). Аминотрансферазы, которые могут продуцировать аспарат и аланин, присутствуют (хотя их уровень сильно варьирует) в бактериоидах сои (Ryan et al., 1972; Stripf, Werner, 1978; Werner, Stripf, 1978; Jin et al., 1990; Kouchi et al., 1991) и клевера (Miller et al., 1991). Аланин может продуцироваться аланиндегидрогеназой, которая также определялась в бактериоидах сои (Miller, Werner, 1982; Jin et al., 1990; Smith, Emerich, 1993) и клевера (Miller et al., 1991). Значение аминокислотного метаболизма в бактериоидах обсуждается в разделе III.D.

III.C.3. Метаболизм ацетил-СоА

Ацетил-СоА занимает центральное место в метаболизме углерода в бактериоидах: работа ТСА цикла требует, чтобы половина малата/сукцината отводилась на ацетил-СоА для того, чтобы образующийся оксалоацетат выполнял функцию акцептора при получении цитрата. Дополнительный источник ацетил-СоА может быть получен при окислении никотината (Kitts et al., 1992), хотя роль этого пути в симбиозе ограничена. Возможное потребление ацетил-СоА включает ТСА цикл, синтез РНВ (см. ниже) или малонил-СоА. Ацетил-СоА-карбоксилазу выявили в свободноживущих клетках *R. etli* (Encarnacion et al., 1995).

III.C.4. Метаболизм поли-β-гидроксibuтирата

Неясным является вопрос о том, почему активное накопление поли-β-гидроксibuтирата (РНВ) происходит в бактериоидах одних ризобий, но отсутствует у других. Объясняя накопление РНВ,

важно оценить метаболический ответ в бактериоидах, приводящий к микроаэробным условиям в клубеньках, а также его варьирование у разных штаммов ризобий (McDermott et al., 1989). Ранние исследования РНВ метаболизма у *Azotobacter beijerinckii* (Senior, Dawes, 1971; Ritchie et al., 1971; Senior et al., 1972; Jackson, Dawes, 1976) указывали на отдельные пути синтеза и деградации РНВ (рис. 1). Синтез РНВ часто происходит, когда поступление углерода превышает поступление других питательных элементов, таких как азот, фосфор, сера, или происходит лимитирование по акцепторам электронов. Эти факторы также могут играть роль при синтезе РНВ в бактериоидах. Синтез РНВ изучался у свободноживущих ризобий при различных условиях, включая солевой стресс и варьирование поступления углерода, азота и кислорода (Stam et al., 1986; De Vries et al., 1986; Bonartseva et al., 1994, 1995; Natarajan et al., 1995). Оказалось, что синтез РНВ у ризобий аналогичен описанному у других грамотрицательных бактерий в условиях, при которых поток углерода в клетку не прерывается, а уменьшается его количество, поступающее в реакции биосинтеза или дыхания, что вызывает увеличение концентрации РНВ в клетках.

У *Azotobacter* при недостатке кислорода происходит уменьшение потока углерода через ТСА цикл из-за ингибирования изоцитратдегидрогеназы (Jackson, Dawes, 1976). Предполагается, что при этом синтез РНВ обеспечивает сток избытка углерода и редуцирующих эквивалентов (Senior, Dawes, 1971; Senior et al., 1972). Этот процесс должен приводить к уменьшению количества углерода, поступающего в ТСА цикл, и уменьшать ингибирующий эффект от избытка восстановителя на изоцитратдегидрогеназу и 2-оксоглутаратдегидрогеназу в реакциях ТСА цикла. Аналогична роль синтеза РНВ в бактериоидах *B. japonicum* (McDermott et al., 1989): изоцитратдегидрогеназа и 2-оксоглутаратдегидрогеназа чувствительны к редуцирующим никотинамидпиридин нуклеотидным кофакторам (McDermott et al., 1989; Salminen, Streeter, 1990). Возможно, что факторы, которые усиливают аккумуляцию РНВ, действуют на нескольких уровнях. В работах по изучению влияния солевого стресса на активности β -кетотиолазы и β -гидроксibuтиратдегидрогеназы (рис. 1) из изолятов корневых клубеньков *Sesbania* (Natarajan et al., 1995) показано, что они обратно пропорциональны активности β -кетотиолазы, возрастающей у клеток, подвергшихся солевому стрессу. Это значит, что у изученных штаммов ферменты синтеза РНВ индуцируются условиями, которые подавляют ферменты деградации РНВ (Natarajan et al., 1995).

Показано (Wong, Evans, 1971; Karr et al., 1984), что содержание РНВ и специфическая активность β -кетотиолазы в бактериоидах сои возрастают параллельно нитрогеназной активности. С использованием ^{14}C и проточных камер для контроля потоков кислорода и углерода изучен РНВ цикл в изолированных бактериоидах сои (Bergersen, Turner, 1990a). Бактериоиды обычно поглощали меченый малат или сукцинат, но большая их часть аккумулировалась в качестве лабильного пула. Примерно половина радиоактивности была обнаружена в РНВ, и включение ^{14}C в РНВ продолжалось после того, как снабжение экзогенными субстратами прекращалось, что говорит о потреблении меток из другого метаболически активного углеродного пула. Интересно, что азотфиксация подавлялась при добавлении 10 мМ дикарбоновых кислот, но при прекращении снабжения углеродом, когда его концентрация опускалась ниже 0.5 мМ, скорость азотфиксации резко возрастала (Bergersen, Turner, 1990b). То, что с увеличением скорости азотфиксации возрастало и количество ^{14}C в РНВ, предполагает быстрое и легкое потребление пула ацетил-СoА. Как и в ранних исследованиях (Stovall, Cole, 1978; Salminen, Streeter, 1987b), значительно более активное выделение $^{14}\text{CO}_2$ при использовании [1,4- ^{14}C]-сукцината, чем [2,3- ^{14}C]-сукцината показывает, что концевые атомы углерода удаляются в реакциях декарбоксилирования малатдегидрогеназой и пируватдегидрогеназой (Bergersen, Turner, 1990a) и/или изоцитратдегидрогеназой и 2-оксоглутаратдегидрогеназой в цикле ТСА. Однако во время синтеза РНВ метка из [U- ^{14}C]-малата, поставляемого бактериоидам, накапливалась в 2 раза быстрее, чем при использовании [2,3- ^{14}C]-сукцината, а $^{14}\text{CO}_2$ выделялся из [U- ^{14}C]-малата в 10 раз быстрее, чем из [2,3- ^{14}C]-сукцината. Эти результаты схожи с обсуждаемыми выше (Salminen, Streeter, 1987b; Kouchi et al., 1991) и означают, что часть сукцината, поглощаемого бактериоидами, превращается в аспартат посредством аспартазы.

Бактериоиды *S. meliloti* дикого типа не содержат РНВ, а РНВ⁻ мутант имеет нормальный симбиотический фенотип (Povolo et al., 1994). Эти наблюдения показывают, что углерод в клубеньках люцерны включается в цикл через РНВ. В противоположность этому, клетки *R. elii* накапливают

Рисунок 1. Обобщенная схема углеродного потока в бактериоидах. Номера соответствуют следующим ферментам: (1) малатдегидрогеназа; (2) малатный фермент; (3) пируватдегидрогеназа; (4) цитратсинтаза; (5) и (6) аконитаза; (7) изоцитратдегидрогеназа; (8) 2-оксоглутаратдегидрогеназа; (9) сукцинаттиокиназа; (10) сукцинатдегидрогеназа; (11) фумараза; (12) аспартаза; (13) аспартаминотрансфераза; (14) аланинаминотрансфераза; (15) аланиндегидрогеназа; (16) лактатдегидрогеназа; (17) β -кетотиолаза; (18) ацетоацетил-CoA-редуктаза; (19) β -гидроксibuтирил-CoA-полимераза; (20) PHB-деполимераза; (21) β -гидроксibuтиратдегидрогеназа; (22) ацетоацетат:сукцинил-CoA-трансфераза; (23) фосфотрансацетилаза; (24) ацетаткиназа; (25) ацетил-CoA-синтаза; (26) альдегиддегидрогеназа; (27) алкогольдегидрогеназа; (28) глутаматдегидрогеназа; (29) глутамин:оксоглутарат-аминотрансфераза; (30) глутаматдекарбоксилаза; (31) γ -аминобутирик-глутамин-трансаминаза; (32) сукцинат полуальдегиддегидрогеназа; (33) пролиндгидрогеназа; (34) малатсинтаза; (35) UDPG-пирофосфорилаза; (36) трегалозо-6-P-синтаза; (37) фосфотрегаллаза; (38) трегаллаза; (39) трегалозофосфорилаза. Трегалозный "цикл" модифицирован на основе предоставленных ранее данных (Mellor, 1988), тогда как остальная информация обновлена (McDermott et al., 1989).

большие количества PHB при различных условиях, включая симбиоз (Encarnacion et al., 1995). PHB мутант *R. etli* формирует на фасоли клубеньки со способностью к более длительной азотфиксации (Cevallos et al., 1996), то есть синтез PHB и азотфиксация приводят к альтернативным превращениям редуцтантов. Свободноживущая культура *R. etli* дикого типа проявляет способность к "ферментативноподобному" росту (Encarnacion et al., 1995), скорость ее роста и масса клеток резко снижаются после субкультивирования на минимальной среде с сукцинатом. Такое состояние характеризуется пониженной активностью ферментов цикла ТСА, накоплением PHB и экскрецией органических кислот и аминокислот. Этот эффект может быть элиминирован высокой концентрацией кислорода или введением в среду специфических добавок, таких как биотин или тиамин. При добавлении биотина ферменты цикла ТСА сохраняют высокий уровень активности, уровень β -кетотиолазы снижается, уровень пируваткарбоксилазы возрастает, хотя активности других биотин-зависимых ферментов не изменены. Ферментативная реакция PHB у мутанта выражена более резко, чем у штамма дикого типа (Cevallos et al., 1996). В целом, накопление органических кислот в среде PHB мутантом было в несколько раз выше, а отношение NADH:NAD в 2 - ~20 раз выше, чем у дикого типа. Это показывает, что углерод, предназначенный для синтеза PHB, экспортируется из клетки в виде органических кислот или аминокислот, что подтверждает роль синтеза PHB в контроле клеточного окислительно-восстановительного потенциала.

III.C.5. Синтез других углеродных соединений

Концентрация трегалозы в клубеньках сои возрастает при азотфиксации, но затем падает (Streeter, 1980). Синтез трегалозы бактериоидами (Reibach, Streeter, 1983; Phillips et al., 1984; Salminen, Streeter, 1986), возможно, является результатом комбинации их ответа на анаэробные условия клубенька (Hoefzle, Streeter, 1990) и активности растения-хозяина. UDP-глюкоза является промежуточным соединением в метаболизме трегалозы (Salminen, Streeter, 1986), и ферменты ее синтеза присутствуют в больших количествах во фракциях растительных клеток и бактериоидов (Salminen, Streeter, 1986; Copeland et al., 1989b; Anthon, Emerich, 1990). UDP-глюкоза поглощается бактериоидами сои в 5 раз быстрее, чем свободная глюкоза (Salminen, Streeter, 1987a), и в бактериоидах обнаруживаются другие ферменты, вовлеченные в биосинтез трегалозы (Salminen, Streeter, 1986). Роль трегалозы в симбиозе неясна (Mellor, 1988; Streeter, 1991), но предполагается, что она может являться частью "холостого" цикла, в котором глюкоза перемещается в бактериод/симбиосому и обратно (Streeter, 1991).

Показано (Streeter et al., 1992), что некоторые штаммы ризобий накапливают полисахариды в симбиосоме. Хотя основа для синтеза полисахаридов в клубеньках неясна, а мутанты, неспособные их продуцировать, имеют нормальный симбиотический фенотип (Streeter et al., 1995), можно предположить, что присутствие полисахаридов оказывает определенное влияние на симбиоз (Streeter, Salminen, 1993).

III.D. МЕТАБОЛИЗМ И ЭКСПОРТ АЗОТА В БАКТЕРОИДАХ

III.D.1. Азотфиксация

Азотфиксация в бактериоидах и ее регуляция детально описаны в главе 23. Как мы упоминали в разделе II, азотфиксация у ризобий регулируется в основном кислородом: в ответ на его низкую концентрацию, двухкомпонентная регуляторная система FixLJ активирует транскрипцию генов *nifA* и/или *fixK*, продукты которых контролируют транскрипцию других *nif*- и *fix*- генов (Fisher, 1994). В случае *B. japonicum*, белок NifA активируется низким уровнем O_2 независимо от FixJ. Индукция азотфиксации в бактериоидах обычно не зависит от азотного статуса клеток, или по крайней мере от Ntr-системы. Таким образом, микроаэробная среда клубенька активирует азотфиксацию бактериоидами. Конечно, азотфиксация требует и других условий, например адекватного снабжения редуцентами и АТФ. Как мы видели, цикл ТСА играет центральную роль в энергетическом метаболизме бактериоидов, но его функционирование при микроаэробных условиях в клубеньке требует участия одной или более терминальных оксидаз, имеющих очень высокое сродство к O_2 . Оперон *fixNOQP* необходим для симбиотической азотфиксации у ризобий и определяет высокое сродство оксидазного комплекса (Fischer, 1994). Транскрипция оперона *fixNOQP* индуцируется белком FixK в ответ на низкую концентрацию O_2 в клубеньке. Электроны, необходимые для восстановления азота на нитрогеназе, могут быть получены из электрон-транспортной цепи, включающей продукты оперона *fixABCX* (Fisher, 1994). Транскрипция этого оперона индуцируется белком NifA в ответ на низкую концентрацию O_2 . Таким образом, она индуцирует экспрессию белков нитрогеназы, также как и других белков, которые обеспечивают снабжение этих ферментов АТФ и электронами.

III.D.2. Ассимиляция азота

Практически весь азот, зафиксированный бактериоидами, уходит в цитоплазму растения, и поэтому ассимиляция нитрата и аммония в бактериоидах подавлена. Активности нитратредуктазы, переносчика аммония, GS, и GOGAT мало связаны с нитрогеназной активностью (Howitt, Gresshoff, 1985; Howitt et al., 1986; Carlson et al., 1987; Shatters et al., 1989; de Bruijn et al., 1989). Так как эти ферменты в норме индуцируются в условиях азотного стресса, вероятно, что бактериоиды в клубеньках не находятся в условиях голодания по азоту. В самом деле, мутации по гену *ntrC*, который необходим для синтеза этих белков, оказывают слабый эффект (или вообще не влияют) на азотфиксацию у ризобий (Gussin et al., 1986; Szeto et al., 1987; Pawlowski et al., 1987; Udvardi et al., 1992). В результате подавления ферментов ассимиляции значительное количество аммония, продуцируемого бактериоидами, теряется в виде NH_3 путем диффузии через мембраны (Bergersen, Turner, 1967). Поскольку бактериоиды не экспрессируют переносчик аммония, эти потери не может быть возвращены. Действительно, аммоний транспортируется через перибактероидное пространство в цитоплазму растительной клетки, вероятно, с помощью переносчика, имеющегося на РВМ (Tuerman et al., 1995).

III.D.3. Метаболизм аминокислот

Для исследования метаболизма симбиотической системы были получены и протестированы различные ауксотрофные мутанты (Kerpolla, Kahn, 1988; Rossbach, Hennecke, 1991). Только некоторые типы ауксотрофов были Fix⁺ во всех симбиозах, что указывает на полноценное снабжение бактериоидов питательными веществами в период формирования симбиоза. Исключение составляют аденозиновые и лейциновые ауксотрофы, которые практически всегда имеют Fix⁺ фенотип (Aguilar, Grasso, 1991; Djordjevic et al., 1996). Однако в исследованиях с ауксотрофами клубеньки не всегда проверялись на реверсии исходных, обычно химически индуцированных мутаций, поэтому формирование клубеньков ревертантами может быть недооценено. Хотя эффективность некоторых хорошо охарактеризованных ауксотрофов может противоречить данным о непроницаемости симбиотической мембраны для аминокислот, очевидно, что скорости переноса питательных компонентов в бактериоиды малы. Поэтому некоторые ауксотрофы могут являться Fix⁺ благодаря недостаточному поглощению бактериоидами необходимых питательных веществ. *hemA* мутант *B. japonicum*

фиксирует азот, но аналогичные мутанты других ризобий — не фиксируют; эти различия связывают с более высокой способностью *B. japonicum* к импорту D-аминолевулиновой кислоты (O'Brian, 1996).

Роль глутаминсинтетаз бактериоидов. Роль каждого из трех ферментов GS в метаболизме бактериоидов до сих пор неясна. Как отмечено выше, активности GS в бактериоидах подавлены (Brown, Dilworth, 1975; Darrow, 1980) и фактически ферменты деградации глутамина обнаруживаются в бактериоидах *R. etli* в больших количествах (Duran, Calderon, 1995). Мутанты в любой из GS, а также GS^IGS^{III} и GS^{II}GS^{III} мутанты нормально растут и формируют азотфиксирующие клубеньки. GS^IGS^{II} мутант *S. meliloti* также эффективен, хотя и нуждается для роста на минимальной среде в высоких концентрациях аммония и аминокислот (de Bruijn et al., 1989; Somerville et al., 1989). Мутант *B. japonicum* с отсутствием GS^I или GS^{II} является неэффективным, но GS^IGS^{II} мутант не способен к инфекции, если в среде отсутствует глутамин, а при его добавлении является неэффективным (Carlson et al., 1987). Мутант *Azorhizobium caulinodans* с отсутствием только GS способен к инфекции, но неэффективен (Donald, Ludwig, 1984). GS^I мутант *R. tropici* формирует меньше клубеньков, чем дикий тип, но мутант *B. japonicum* по GS^I или GS^{II} формирует повышенное число клубеньков с более высокой специфичной активностью (Carlson et al., 1987). Мутант с отсутствием сайта аденилирования в белке GS^I остается эффективным, что приводит к предположению о том, что такая посттрансляционная модификация не является необходимой для симбиоза (Arcondeguy et al., 1996). Белок GS^{II} не обнаружен в клубеньках люцерны и сои, образованных нормальными формами ризобий (Shatters et al., 1989), но mRNA GS^{II} обнаружена у *B. japonicum*, выделенных из клубеньков сои (Martin et al., 1988). Белок GS^{III} найден в клубеньках, формируемых двойным мутантом *S. meliloti* (Shatters et al., 1993).

Роль аспаратаминотрансферазы бактериоидов. Мутант *S. meliloti* с недостатком ААТ-А является неэффективным (Rastogi, Watson, 1991), но может быть комплементирован генами *aatA* или *tatA*, которые кодируют тирозинаминотрансферазу, обладающую существенной аспаратаминотрансферазной активностью. Так как *aatA* мутант не является аукоотрофным по аспартату, причиной симбиотического дефекта может быть неспособность к поддержанию высокой активности ААТ. Зависимость симбиоза *S. meliloti*-люцерна от ААТ показывает, что обмен органическими кислотами и аминокислотами сходен с малат-аспартатным челноком, функционирующим в митохондриях (Meijer, VanDam, 1974), и играет роль в метаболизме симбиоза. Работы с *R. leguminosarum* (Appels, Haaker, 1991) и *B. japonicum* (Streeter, Salminen, 1990) показали, что бактериоиды и свободноживущие бактерии склонны участвовать в таком процессе, так как они выделяют аспартат и α-кетоглутарат в присутствии малата и глутамата. Так как бактериоиды снабжаются дикарбоксилатами, главным аргументом против функционирования челнока является отсутствие транспорта глутамата через симбиосомную мембрану (Udvardi et al., 1988b). Тем не менее, возможен транспорт глутамата через симбиосомную мембрану в высоких, но физиологических концентрациях (Kouchi et al., 1991). Недавно на основе анализа кинетики растительных ААТ ферментов было высказано предположение о том, что синтез аспартата в растении не настолько интенсивен, чтобы создавать предшественники для его экспорта из клубеньков гороха (Haaker et al., 1995). Это предполагает, что классический челнок в клубеньках может быть модифицирован транспортом малата из растительной цитоплазмы в симбиосому, в которых он амидирует синтезированный аспартат для его дальнейшего транспорта из клубенька.

Метаболизм триптофана. Метаболизм триптофана интересен с точки зрения сравнения с другими биохимическими путями (Bae, Crawford, 1990) и потому, что триптофан является предшественником для синтеза растительного гормона — индолилуксусной кислоты (IAA или ауксин). У *Agrobacterium* превращение триптофана в IAA через индолацетамид с использованием триптофан-монооксигеназного пути напрямую вовлечено в формирование опухолей (Thomashow et al., 1986). Второй этап этого пути обнаружен у *R. leguminosarum* (Kawaguchi et al., 1990). Первый фермент синтеза ароматических аминокислот у *S. meliloti*, ДНАР-синтетаза, необходим для эффективного симбиоза (Jelesko et al., 1993). Мутанты с блокированными конечными этапами синтеза триптофана формируют эффективные клубеньки, но мутанты, неспособные к синтезу антранилата, являются или частично эффективными, или неэффективными (Barsomian et al., 1992). Возможно, что

антранилат необходим в качестве сидерофора, или же экскреция промежуточных продуктов биосинтеза влияет на метаболизм ауксина в растении. Четыре ароматические аминотрансферазы, которые могут использовать триптофан в качестве субстрата, найдены у *S. meliloti* (Kittell et al., 1989). Мутации в двух главных ферментах не влияют на функционирование клубенька, хотя обе мутации понижают уровень IAA при добавлении больших концентраций триптофана.

III.E. МЕТАБОЛИЗМ АЗОТА У РАСТЕНИЙ

Экспортируемый симбиосомами аммоний быстро включается в глутамин и глутамат при помощи глутаминсинтетазы (GS) в цитоплазме и глутаматсинтазы (GOGAT) в пластидах (Atkins, 1991). Пути ассимиляции аммония индуцируются в процессе развития клубеньков и включают экспрессию клубенекспецифичных изоформ GS и GOGAT в симбиосомах (Atkins, 1991). Возможно, что произведенный бактериоидами аммоний играет роль в регуляции некоторых ферментов его ассимиляции (Hirel et al., 1987; Atkins, 1991). У некоторых бобовых глутамин транспортируется из клубеньков для использования в других частях растения (Atkins, 1991). Тем не менее, основные транспортные формы азота экспортируются клубеньками. В целом, у бобовых умеренных широт (горох и люцерна), экспорт азота из клубеньков происходит в форме амидов (в особенности аспарагина, но также и глутамина), тогда как у тропических бобовых (соя) азот экспортируется в виде уреидов аллантаина и аллантаиновой кислоты (Atkins, 1991). Постоянный синтез и экспорт аспарагина из клубеньков требует стабильного снабжения предшественниками аспартата - оксалоацетатом или малатом. Как отмечалось в разделе III.B, активности PEP-карбоксилазы и малатдегидрогеназы в клубеньках высоки, и результаты многочисленных исследований показали, что фиксация CO_2 PEP-карбоксилазой связана с синтезом амида. Интересно, что добавление аммония к анаэробным клеткам зеленой водоросли *Selenastrum minutum* приводит к 8-кратному усилению фиксации CO_2 посредством PEP-карбоксилазы, которая, по-видимому, необходима для синтеза предшественников аминокислот в отсутствие активного цикла TCA (Vanlerberghe, Turpin, 1990). Заманчиво предположить, что экспортируемый бактериоидами аммоний способен индуцировать активность растительной PEP-карбоксилазы в микроаэробных условиях клубенька. Обусловленная высокой активностью растительной малатдегидрогеназы в клубеньках, индукция PEP-карбоксилазной активности должна повышать скорость продукции оксалоацетата и малата, необходимых как для синтеза растением аминокислот, так и для снабжения бактериоидов C-4-дикарбоксилатами.

Синтез уреидов включает образование *de novo* пурина и оно резко усиливается при развитии клубеньков, особенно в ответ на экспортируемый бактериоидами аммоний (Atkins, 1991). Таким образом, экспорт аммония бактериоидами оказывает положительный эффект не только на ассимиляцию аммония, но и на продукцию различными бобовыми уреидов и амидов.

IV. Выводы и перспективы

В первой статье о ризобиях Бейеринк (Beijerinck, 1888), изучая свойства свободноживущих бактерий, писал: "поскольку у организма требуется несложное питание, симбиотические взаимоотношения с бобовыми растениями кажутся удивительными, так как, за исключением сахаров, питательные потребности бактерий также просты, как и у самого растения, и мы знаем много несимбиотических организмов, таких как *Bacillus* [*Pseudomonas*] *fluorescens*, которые имеют столь же простые потребности". Бейеринк также заметил, что "было невозможно продемонстрировать фиксацию газообразного азота (в культуре)" и сделал заключение: "мне кажется невероятным, что бактерии с сильными химическими способностями, такими как фиксация азота, являются подходящими в условиях становления такого тонкого баланса. Следовательно, только организмы, подобные *Bacillus radicola* (*Rhizobium*), подобные по своим химическим свойствам протоплазме растительной клетки, будут подходить для таких симбиотических взаимоотношений".

Из этой части книги очевидно, что мы много узнали о ризобиях и симбиозе после 1888 года. Например, больше не вызывает удивления способность ризобий к фиксации азота при симбиозе,

несмотря на ее отсутствие в культуре. Несомненно, существует больше различий, чем сходства между метаболическими возможностями ризобий и бобовых, что дает им выгоду от совместного существования. Поскольку азотфиксация у ризобий дополняет фиксацию углерода растением, последнее получает возможность расти на почвах, лишенных связанного азота, а ризобии получают доступ к эффективным источникам связанного углерода.

За последнее столетие накоплено множество данных о метаболизме ризобий и их растений-хозяев, и выяснена общая картина взаимодействия систем их углеродного и азотного обмена. Сейчас мы знаем, что для успешных взаимоотношений, симбиотический метаболизм должен осуществляться при микроаэробных условиях потому, что нитрогеназа, фермент бактериоидов, крайне чувствительна к O_2 . Однако микроаэробные условия в клубеньках оказывают глубокое влияние на другие аспекты метаболизма растения и бактериоидов, особенно на метаболизм углерода. Сахароза, поступающая в клубеньки из растения, метаболизируется в цитоплазме до малата и других дикарбоновых кислот, транспортируемых в бактериоиды. Цикл ТСА в бактериоидах обеспечивает использование этого углерода, и активность терминальных оксидаз с очень высоким сродством позволяет бактериоидам эффективно конкурировать с митохондриями за O_2 . Дыхание бактериоидов и окислительное фосфорилирование обеспечивают процесс азотфиксации редуцентами и АТФ, хотя способ такого обеспечения остается неясным. Значительное количество входящего в бактериоидный цикл ТСА малата/сукцината окисляется только частично и судьба этого углерода представляется важной. Возвращается ли он к растению-хозяину вместе с восстановленным азотом? Если это так, возвращается ли какое-то количество этого экспортированного углерода обратно в бактериоиды? Судьба синтезированных в бактериоидах аминокислот также неясна, и это является важной областью будущих исследований.

Несмотря на некоторую противоречивость данных о роли аминокислотного метаболизма бактериоидов, многие ключевые аспекты азотного обмена клубеньков уже хорошо поняты. Бактериоиды являются экспортирующими аммоний органеллами, так как ассимиляция аммония в них репрессирована, несмотря на высокую скорость азотфиксации. Аммоний переносится в цитоплазму растения, где он включается, перед дальнейшим экспортом из клубенька, в глутамин, а затем в другие амиды или уреиды. Аммоний активирует экспрессию ферментов, необходимых для его ассимиляции растением, включая те ферменты, которые обеспечивают образование необходимых для ассимиляции и транспорта азота углеродных скелетов.

Симбиоз обеспечивает очевидное экологическое преимущество для обоих партнеров, но почему бактериоиды потребляют столь значительное количество энергии при азотфиксации, несмотря на то, что они практически полностью лишены способности к ассимиляции произведенного аммония? Ответ на этот вопрос может появиться тогда, когда мы определим условия, необходимые для достижения высокой скорости азотфиксации *in vitro* у всех ризобий, а не только у *Azorhizobium*. Анализ режима азотфиксации *ex planta* может привести к выяснению новых физиологических свойств бактериоидов, а именно ингибирования деления клеток и резкого снижения жизнеспособности. Интересно, что высокие концентрации дикарбоновых кислот, вместе с низким pH, подавляет рост ризобий *ex planta* (Perez-Galdona, Kahn, 1994). Так как такие условия могут преобладать внутри симбиосом, они оказывают аналогичный эффект на бактериоиды. Поэтому будет интересно получить новые данные о химических и физических факторах, лимитирующих формирование популяции бактериоидов в клубеньках.

Азотфиксирующий симбиоз является одним из путей сопряжения циклов азота и углерода в экосистемах. Такое сопряжение требует интеграции углеродного и азотного метаболизма растения и бактерий, и представляется очевидным, что организмы взаимно регулируют активность на многих уровнях. Изучение углеродного и азотного метаболизма у ризобий обогащает наше понимание этого взаимодействия и будет, несомненно, продолжено в будущем.

V. Литература

- Aguilar O.M., Grasso D.H. (1991) J. Bacteriol. V. 173, p. 7756-7764.
Alfano J.R., Kahn M.L. (1993) J. Bacteriol. V. 175, p. 4186-4196.

- Amar M., Patriarca E.J., Manco G., Bernard P., Riccio A., Lamberti A., Defez R., Iaccarino M. (1994) *Molec. Microbiol.* V. 11, p. 685-693.
- Ames G.F.L., Nikaido K. (1985) *EMBO J.* V 4, p. 539-547.
- Anderson W.A., Magasanik B. (1971a) *J. Biol. Chem.* V. 246, p. 5653-5661.
- Anderson W.A., Magasanik B. (1971b) *J. Biol. Chem.* V. 246, p. 5662-5675.
- Anthon O.E., Emerich D.W. (1990) *Plant Physiol.* V. 92, p. 346-351.
- Appels M.A., Haaker H. (1991) *Plant Physiol.* V. 95, p. 740-747.
- Appleby C.A. (1992) *Sci. Progress.* V. 76, p. 365-398.
- Arcondeguy T., Huez I., Fourment J., Kahn D. (1996) *FEMS Microbiol. Letters.* V. 145, p. 33-40.
- Arias A., Gardiol A., Martinez-Drets G. (1982) *J. Bacteriol.* V. 151, p. 1069-1072.
- Arias A., Martinez-Drets G. (1976) *Can. J. Microbiol.* V. 22, p. 150-153.
- Arwas R., Glenn A.R., McKay I.A., Dilworth M.J. (1986) *J. Gen. Microbiol.* V. 132, p. 2743-2747.
- Atkins C.A. (1991) In: M.J. Dilworth, A.R. Glenn (eds.) *Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation*, Elsevier, Amsterdam, p. 293-319.
- Ausubel F.M. (1984) *Cell.* V. 37, p. 5-6.
- Ausubel F.M., Buikema W.J., Earl C.D., Klingensmith B.T., Nixon B.T., Szeto W.W. (1985) In: H.J. Evans, P.J. Bottomley, W.E. Newton (eds.) *Nitrogen Fixation Research Progress*, Martinus Nijhoff, Dordrecht, p. 167-179.
- Bac Y.M., Crawford I.P. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 3318-3327.
- Barsomian G.D., Urzainqui A., Lohman K., Walker G.C. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 4416-4426.
- Batista S., Castro S., Aguilar O.M., Martinez-Drets G. (1992) *Can. J. Microbiol.* V. 38, p. 51-55.
- Beijerinck M.W. (1888) *Botanische Zeitung.* V. 46, p. 725-804.
- Bergersen F.J. (1977) In: R.W.F. Hardy, W. Silver (eds.) *A Treatise on Dinitrogen Fixation*, Section III, Biology, Wiley, NY, p. 519-556.
- Bergersen F.J., Turner G.L. (1967) *Biochim. Biophys. Acta.* V. 141, p. 507-515.
- Bergersen F.J., Turner G.L. (1990a) *Proc. Roy. Soc. (Lond.) B.* V. 240, p. 39-59.
- Bergersen F.J., Turner G.L. (1990b) *Proc. R. Soc. (Lond.) B.* V. 238, p. 295-320.
- Berman T., Magasanik B. (1966a) *J. Biol. Chem.* V. 241, p. 800-806.
- Berman T., Magasanik B. (1966b) *J. Biol. Chem.* V. 241, p. 807-813.
- Betlach M.R., Tiedje J.M., Firestone R.B. (1981) *Arch. Microbiol.* V. 129, p. 135-140.
- Bolton E., Higginson B., Harrington A., O'Gara F. (1986) *Arch. Microbiol.* V. 144, p. 142-146.
- Bonartseva G.A., Myshkina V.L., Zagreba E.D. (1994) *Microbiology.* V. 63, p. 45-48.
- Bonartseva G.A., Myshkina V.L., Zagreba E.D. (1995) *Microbiology.* V. 64, p. 30-33.
- Brock T.D. (1961) *Milestones of Microbiology*, ASM Press, Washington, DC, p. 220-224.
- Brown C.M., Dilworth M.J. (1975) *J. Gen. Microbiol.* V. 86, p. 39-48.
- Brown S.M., Walsh K.B. (1994) *Austral. J. Plant Physiol.* V. 21, p. 49-68.
- Burris R.H., Roberts G.P. (1993) *Annu. Rev. Nutr.* V. 13, p. 317-335.
- Butler G.W., Bathurst N.O. (1958) *Austral. J. Biol. Sci.* V. 11, p. 529-537.
- Carlson T.A., Chelm B. (1986) *Nature.* V. 322, p. 568-570.
- Carlson T.A., Martin G.B., Chelm B.K. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 5861-5866.
- Cervenansky C., Arias A. (1984) *J. Bacteriol.* V. 160, p. 1027-1030.
- Cevallos M.A., Encarnacion S., Leija A., Mora Y., Mora J. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 1646-1654.
- Chakrabarti S.M., Lee S., Gibson A.H. (1981) *Soil Biol. Biochem.* V. 13, p. 349-354.
- Charles T.C., Finan T.M. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 2469-2476.
- Charles T.C., Finan T.M. (1991) *Genetics.* V. 127, p. 5-20.
- Charles T.C., Singh R.S., Finan T.M. (1990) *J. Gen. Microbiol.* V. 136, p. 2497-2502.
- Chen Y.P., Dilworth M.J., Glenn A.R. (1984a) *Arch. Microbiol.* V. 138, p. 187-190.
- Chen Y.P., Glenn A.R., Dilworth M.J. (1984b) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 21, p. 201-205.
- Chenae G., Evans H.J. (1960) *Plant Physiol.* V. 35, p. 454-562.
- Chien C.T., Rupp R., Beck S., Orser C.S. (1991) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 77, p. 299-302.
- Christeller J.T., Laing W.A., Sutton W.D. (1977) *Plant Physiol.* V. 60, p. 47-50.
- Clark D.P., Cronan Jr. J.E. (1996) In: F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger (eds.) *Escherichia coli and Salmonella*, Cellular and Molecular Biology, ASM Press, American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 343-357.
- Coker G.T., Shubert K.R. (1981) *Plant Physiol.* V. 67, p. 691-696.
- Copeland L., Quinell R.G., Day D.A. (1989a) *J. Gen. Microbiol.* V. 135, p. 2005-2011.
- Copeland L., Vella J., Hong Z. (1989b) *Phytochemistry.* V. 28, p. 57-61.
- Daniel R.M., Appleby C.A. (1972) *Biochim. Biophys. Acta.* V. 275, p. 347-354.
- Darrow R.A. (1980) In: J. Mora, R. Palacios (eds.), *Glutamine Synthetase, Metabolism, Enzymology and Regulation*. Academic Press, p. 139-166.
- Day D.A., Copeland L. (1991) *Plant Physiol. Biochem.* V. 29, p. 185-201.
- De Bruijn F.J., Rossbach S., Schneider M., Ratet P., Messmer S., Szeto W.W., Ausubel F.M., Schell J. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 1673-1682.
- De Vries G.E., In't Veld P., Kijne J.W. (1980) *Plant Sci. Lett.* V. 20, p. 115-123.

- De Vries W., Stam H., Duys J.G., Ligtenberg A.J.M., Simons L.H., Stouthamer A.H. (1986) *Ant. van Leeuwenhoek*. V. 52, p. 85-96.
- Dilworth M.J., Arwas R., McKay I.A., Saroso S., Glenn A.R. (1986) *J. Gen. Microbiol.* V. 132, p. 2733-2742.
- Djordjevic S.P., Weinman J.J.L., Redmond J.W., Djordjevic M.A., Rolfe B.G. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 9, p. 114-124.
- Donald R.G., Ludwig R.A. (1984) *J. Bacteriol.* V. 158, p. 1144-1151.
- Driscoll B.T., Finan T.M. (1993) *Mol. Microbiol.* V. 7, p. 865-873.
- Driscoll B.T., Finan T.M. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 2224-2231.
- Duncan M.J. (1979) *J. Gen. Microbiol.* V. 113, p. 177-179.
- Duncan M.J. (1981) *J. Gen. Microbiol.* V. 122, p. 61-67.
- Duncan M.J., Fraenkel D.G. (1979) *J. Bacteriol.* V. 37, p. 415-419.
- Dunn M.F., Encarnacion S., Araiza G., Vargas M.C., Davalos A., Peralta H., Mora Y., Mora J. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 5960-5970.
- Duran S., Calderon J. (1995) *Microbiol.* V. 141, p. 589-595.
- El Din A.K.Y.G. (1992) *Can. J. Microbiol.* V. 38, p. 230-234.
- El Guezzer M., Hornez J.P., Courtois B., Derieux J.C. (1988) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 49, p. 429-434.
- Encarnacion S., Dunn M., Willms K., Mora J. (1995) *J. Bacteriol.* V. 177, p. 3058-3066.
- Engelke T., Jagdish M.N., Puhler A. (1987) *J. Gen. Microbiol.* V. 133, p. 3019-3029.
- Engelke T., Jording D., Kapp D., Puhler A. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 5551-5560.
- Espin G., Moreno S., Guzman J. (1994) *Crit. Rev. Microbiol.* V. 20, p. 117-123.
- Espin G., Moreno S., Wild M., Meza R., Iaccarino M. (1990) *Mol. Gen. Genet.* V. 223, p. 513-516.
- Finan T.M., McWhinnie E., Driscoll B., Watson R.J. (1991) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 4, p. 386-392.
- Finan T.M., Oresnik I., Bottacin A. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 3396-3403.
- Finan T.M., Wood J.M., Jordan D.C. (1981) *J. Bacteriol.* V. 148, p. 193-202.
- Finan T.M., Wood J.M., Jordan D.C. (1983) *J. Bacteriol.* V. 154, p. 1403-1413.
- Fischer H.M. (1994) *Microbiol. Rev.* V. 58, p. 352-386.
- Fougere F., Rudulier D.L., Streeter J.G. (1991) *Plant Physiol.* V. 96, p. 1228-1236.
- Freney J.R., Gibson A.H. (1975) *Austral. J. Plant Physiol.* V. 2, p. 663-668.
- Gajendiran N., Mahadevan A. (1988) *Plant and Soil*. V. 108, p. 263-266.
- Gardiol A.E., Truchet G.L., Dazzo F.B. (1987) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 53, p. 1947-1950.
- Giannakis C., Nicholas D.J.D., Wallace W. (1988) *Plant*. V. 174, p. 51-58.
- Glenn A.R., Dilworth M.J. (1981a) *J. Gen. Microbiol.* V. 126, p. 243-247.
- Glenn A.R., Dilworth M.J. (1981b) *Arch. Microbiol.* V. 129, p. 233-239.
- Glenn A.R., Holliday S., Dilworth M.J. (1991) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 82, p. 307-312.
- Glenn A.R., McKay I.A., Arwas R., Dilworth M.J. (1984) *J. Gen. Microbiol.* V. 130, p. 239-245.
- Gollop R., Avissar Y.J. (1984) *Can. J. Microbiol.* V. 30, p. 890-893.
- Gonzalez-Gonzalez R., Botsford J.L., Lewis T. (1990) *Can. J. Microbiol.* V. 36, p. 469-474.
- Gordon A.J., Ryle G.J.A., Mitchell D.F., Powell C.E. (1985) *J. Exp. Bot.* V. 36, p. 756-769.
- Gussin G.N., Ronson C.W., Ausubel F.M. (1986) *Annu. Rev. Genet.* V. 20, p. 567-591.
- Haaker H., Szafrau M.M., Wassink H.J., Appels M.A. (1995) In: I.A. Tikhonovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov, W.E. Newton (eds.) *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 564-572.
- Harris R.F. (1981) In: J.F. Pair, W.R. Gardner, L.F. Elliot (eds.) *Water Potential Relations in Soil Microbiology*. Soil Science Society of America. Madison, WI, p. 23-95.
- Herrada G., Puppo A., Rigaud J. (1989) *J. Gen. Microbiol.* V. 135, p. 3165-3177.
- Hirel B., Bouet C., King B., Layzell B., Jacobs F., Verma D.P.S. (1987) *EMBO J.* V. 6, p. 1167-1171.
- Hirschman J., Wong P.K., Sei K., Keener J., Kustu S. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 82, p. 7525-7529.
- Hoelzle I., Streeter J.G. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 56, p. 3213-3215.
- Hong Z.Q., Copeland L. (1990) *Phytochem.* V. 8, p. 2437-2440.
- Hornez J.P., Timinouni M., Defives C., Derieux J.C. (1994) *Curr. Microbiol.* V. 28, p. 225-229.
- Howitt S.M., Gresshoff P.M. (1985) *J. Gen. Microbiol.* V. 132, p. 257-261.
- Howitt S.M., Day D.A., Scott K.F., Gresshoff P.M. (1988) *J. Plant Physiol.* V. 132, p. 5-9.
- Howitt S.M., Udvardi M.K., Day D.A., Gresshoff P.M. (1986) *J. Gen. Microbiol.* V. 132, p. 257-261.
- Humbeck C., Werner D. (1987) *Endocyt. Cell Research*. V. 4, p. 185-196.
- Hunt T.P., Magasanik B. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 83, p. 8453-8457.
- Hussein Y.A., Tewfik M.S., Hamdi Y.A. (1974) *Soil Biol. Biochem.* V. 6, p. 377-381.
- Irigoyen J.J., Sanchez-Diaz M., Emerich D.W. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 56, p. 2587-2589.
- Jackson F.A., Dawes E.A. (1976) *J. Gen. Microbiol.* V. 97, p. 303-312.
- Jclesko J.G., Lara J.C., Leigh J.A. (1993) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 6, p. 135-143.
- Jclesko J.G., Leigh J.A. (1994) *Mol. Microbiol.* V. 11, p. 165-173.
- Jimenez-Zurdo J.I., Dillewijn P.V., Soto M.J., DeFelipe M.R., Olivares J., Toro N. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 492-498.
- Jimenez-Zurdo J.I., Garcia-Rodriguez F.M., Toro N. (1997) *Mol. Microbiol.* V. 23, p. 85-93.
- Jin H.N., Dilworth M.J., Glenn A.R. (1990) *Arch. Microbiol.* V. 153, p. 455-462.

- Johnson G.V., Evans H.J., Ching T.M. (1966) *Plant Physiol.* V. 41, p. 1330-1336.
- Jording D., Sharma P.K., Schmidt R., Engelke T., Uhde C., Puhler A. (1992) *J. Plant Physiol.* V. 141, p. 18-27.
- Jording D., Uhde C., Schmidt R., Puhler A. (1994) *Experientia.* V. 50, p. 874-883.
- Kahn M.L., Kraus J., Sommerville J.E. (1985) In: H.J. Evans, P.J. Bottomley, W.E. Newton (eds.) *Nitrogen Fixation Research Progress*, Martinus Nijhoff, Dordrecht, p. 193-199.
- Karr D.B., Waters J.K., Suzuki F., Emerich D.W. (1984) *Plant Physiol.* V. 75, p. 1158-1162.
- Katznelson H., Zagallo A.C. (1957) *Can. J. Microbiol.* V. 3, p. 879-884.
- Kawaguchi M., Sekine M., Syono K. (1990) *Plant Cell Physiol.* V. 31, p. 449-455.
- Keele B.B., Hamilton Jr. P.B., Elkan G.H. (1969) *J. Bacteriol.* V. 97, p. 1184-1191.
- Kerpolla T.K., Kahn M.L. (1988) *J. Gen. Microbiol.* V. 134, p. 913-919.
- Kim Y.S., Chae H.Z. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* V. 169, p. 692-699.
- Kim Y.S., Chae H.Z. (1991) *Biochem. J.* V. 273, p. 511-516.
- Kim Y.S., Kang S.W. (1994) *J. Biol. Chem.* V. 269, p. 8014-8021.
- Kimura I., Tajima S. (1989) *Soil Sci. Plant Nutr.* V. 35, p. 271-279.
- Kiss G.B., Vincze E., Kalman Z., Forrai T., Kondorosi A. (1979) *J. Gen. Microbiol.* V. 113, p. 105-118.
- Kittell B.L., Helinski D.R., Ditta G.S. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 5458-5466.
- Kitts C.L., LaPointe J.P., Lam V.T., Ludwig R.A. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 7791-7797.
- Kohl D.H., Kennedy E.J., Zhu Y.-X., Shubert K.R., Shearer G. (1991) *J. Exp. Bot.* V. 42, p. 831-837.
- Kohl D.H., Schubert K.R., Carter M.B., Hagedorn C.H., Shearer G. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 85, p. 2036-2040.
- Kohl D.H., Straub P.F., Shearer G. (1994) *Plant Cell Environ.* V. 17, p. 1257-1262.
- Kouchi H., Nakaji K. (1985) *Soil Sci. Plant Nutr.* V. 31, p. 323-334.
- Kouchi H., Yoneyama T. (1986) *Physiol. Plant.* V. 68, p. 238-244.
- Kouchi H., Fukai K., Katagiri H., Minamisawa K., Tajima S. (1988) *Physiol. Plant.* V. 73, p. 327-334.
- Kouchi H., Fukai K., Kihara A. (1991) *J. Gen. Microbiol.* V. 137, p. 2901-2910.
- Kustu S., North A., Weiss D.A. (1991) *Trends Biochem. Sci.* V. 16, p. 397-402.
- Larher F., Goas G., Le Rudulier D., Gerard J., Hamelin J. (1983) *Plant Sci. Lett.* V. 29, p. 315-326.
- Lawrie A.C., Wheeler C.T. (1975) *New Phytol.* V. 74, p. 437-445.
- Lepo J.E., Hanus F.J., Evans H.J. (1980) *J. Bacteriol.* V. 141, p. 661-670.
- Lewis T.A., Gonzalez R., Botsford J.L. (1990) *J. Bacteriol.* V. 172, p. 2413-2420.
- Lowe R.H., Evans H.J. (1962) *Soil Sci.* V. 94, p. 351-356.
- Lynch A.S., Lin E.C.C. (1996) In: F.C. Neidhardt, R. Curtiss, H.J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schachter, H.E. Umbarger (eds.) *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*, ASM Press, American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 1526-1538.
- Magasanik B. (1993) *J. Cell. Biochem.* V. 51, p. 34-40.
- Malik K.A., Schlegel H.G. (1981) *FEMS Microbiol. Letts.* V. 11, p. 63-67.
- Manco G., Rossi M., Defez R., Lamberti A., Percuoco G., Iaccarino M. (1992) *J. Gen. Microbiol.* V. 138, p. 1453-1460.
- Manhart J.R., Wong P.P. (1979) *Can. J. Microbiol.* V. 25, p. 1169-1174.
- Manian S.S., O'Gara F. (1982) *Arch. Microbiol.* V. 131, p. 51-54.
- Martin G.B., Chapman K.A., Chelm B.K. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 5452-5459.
- Martinez De Drets G., Arias A. (1970) *J. Bacteriol.* V. 103, p. 97-103.
- Martinez De Drets G., Arias A. (1972) *J. Bacteriol.* V. 109, p. 467-470.
- Martinez De Drets G., Arias A., Rovira de Cutinella M. (1974) *Can. J. Microbiol.* V. 20, p. 605-609.
- McAllister C.F., Lepo J.E. (1983) *J. Bacteriol.* V. 153, p. 1155-1162.
- McDermott T.R., Griffith S.M., Vance C.P., Graham P.H. (1989) *FEMS Microbiol. Rev.* V. 63, p. 327-340.
- McDermott T.R., Kahn M.L. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 4790-4797.
- McKay I.A., Dilworth M.J., Glenn A.R. (1988) *J. Gen. Microbiol.* V. 134, p. 1433-1440.
- McKay I.A., Glenn A.R., Dilworth M.J. (1985) *J. Gen. Microbiol.* V. 131, p. 2067-2073.
- Mendoza A., Leija A., Martinez-Romero E., Hernandez G., Mora J. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 584-592.
- Meijer A.J., VanDam K. (1974) *Biochem. Biophys. Acta.* V. 346, p. 213-244.
- Mellor R.B. (1988) *J. Plant Physiol.* V. 133, p. 173-177.
- Merrick M.J., Gibbins J.R. (1985) *Nucleic Acids Res.* V. 13, p. 7607-7619.
- Miller R.W., McRae D.G., Al Jobore A., Berndt W.B. (1988) *J. Cell. Biochem.* V. 38, p. 35-49.
- Miller R.W., McRae D.G., Joy K. (1991) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 4, p. 37-45.
- Monza J., Delgado M.J., Bedmar E.J. (1992) *Plant and Soil.* V. 139, p. 203-207.
- Muller P., Werner D. (1982) *Z. Naturforsch.* V. 37c, p. 927-936.
- Mulongoy K., Elkan G.H. (1977) *J. Bacteriol.* V. 131, p. 179-187.
- Muthukumar G., Amnakumari A., Mahadevan A. (1982) *Plant and Soil.* V. 69, p. 163-169.
- Natarajan K., Kishore L., Babu C.R. (1995) *Microbios.* V. 82, p. 95-107.
- Niel C., Guillaume J.B., Bechet M. (1977) *Can. J. Microbiol.* V. 23, p. 1178-1181.
- Nixon B.T., Ronson C.W., Ausubel F.M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 83, p. 7850-7854.
- Noguez R., Moreno S., Guzman J., Espin G. (1994) *Can. J. Microbiol.* V. 40, p. 965-968.
- O'Brian M. (1996) *J. Bacteriol.* V. 178, p. 2471-2478.

- O'Hara F., Manian S., Meade J. (1984) FEMS Microbiol. Lett. V. 24, p. 241-245.
- O'Hara G.W., Daniel R.M., Steele K.W. (1983) J. Gen. Microbiol. V. 129, p. 2405-2412.
- Osborne M.S., Signer E.R. (1980) J. Bacteriol. V. 143, p. 1234-1240.
- Osteras M., Driscoll B.T., Finan T.M. (1995) J. Bacteriol. V. 177, p. 1452-1460.
- Osteras M., Finan T.M., Stanley J. (1991) Mol. Gen. Genet. V. 230, p. 257-269.
- Ou Yang L.-J., Udvardi M.K., Day D.A. (1990) Planta. V. 182, p. 437-444.
- Parke D., Ornston L.N. (1984) J. Gen. Microbiol. V. 130, p. 1743-1750.
- Parke D., Ornston L.N. (1986) J. Bacteriol. V. 165, p. 288-292.
- Pawlowski K., Ratet P., Schell J., de Bruijn F.J. (1987) Mol. Gen. Genet. V. 206, p. 207-219.
- Pedrosa F.O., Zancan G.T. (1974) J. Bacteriol. V. 119, p. 336-338.
- Perez-Galdona R., Kahn M.L. (1994) Microbiol. V. 140, p. 1231-1235.
- Pesole G., Gissi C., Lanave C., Saccone C. (1995) Mol. Biol. Evolution. V. 12, p. 189-197.
- Peterson J.B., LaRue T.A. (1981) Plant Physiol. V. 68, p. 489-493.
- Peterson J.B., LaRue T.A. (1982) J. Bacteriol. V. 151, p. 1473-1484.
- Phillips D.A. (1980) Annu. Rev. Plant Physiol. V. 31, p. 29-49.
- Phillips D.V., Wilson D.O., Dougherty D.E. (1984) J. Agric. Food Chem. V. 32, p. 1289-1291.
- Podila G.K., Kotagiri S., Shantharam S. (1993) Appl. Environ. Microbiol. V. 59, p. 2717-2719.
- Poole P.S., Blyth A., Reid C.J., Walters K. (1994) Microbiol. V. 140, p. 2787-2795.
- Povolo S., Tombolini R., Morea A., Anderson A.J., Casella S., Nuti M.P. (1994) Can. J. Microbiol. V. 40, p. 823-829.
- Preston G.G., Zeiher C., Wall J.D., Emerich D.W. (1989) Appl. Environ. Microbiol. V. 55, p. 165-170.
- Rastogi V.K., Watson R.J. (1991) J. Bacteriol. V. 173, p. 2879-2887.
- Rawsthorne S., LaRue T.A. (1986) Plant Physiol. V. 81, p. 1092-1096.
- Reibach P.H., Streeter J.G. (1983) Plant Physiol. V. 72, p. 634-640.
- Reibach P.H., Streeter J.G. (1984) J. Bacteriol. V. 159, p. 47-52.
- Reitzer L. (1996) In: F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schachter, H.E. Umbarger (eds.) *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology (2-nd edition), ASM Press, American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 380-407.
- Rhee S.G., Chock P.B., Stadtman E.R. (1985) Meth. Enzymol. V. 113, p. 213-241.
- Ritchie G.A.F., Senior P.J., Dawes E.A. (1971) Biochem. J. V. 121, p. 309-316.
- Robson R.L., Postgate J.R. (1980) Ann. Rev. Microbiol. V. 34, p. 183-207.
- Rohm M., Weiner D. (1983) Arch. Microbiol. V. 140, p. 375-379.
- Romanov V.I., Hernandez-Lucas I., Martinez-Romero E. (1994) Appl. Environ. Microbiol. V. 60, p. 2339-2342.
- Ronson C.W., Astwood P.M., Downie J.A. (1984) J. Bacteriol. V. 160, p. 903-909.
- Ronson C.W., Lyttleton P., Robertson J.G. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 78, p. 4284-4288.
- Ronson C.W., Nixon B.T., Albright L.M., Ausubel F.M. (1987) J. Bacteriol. V. 169, p. 2424-2431.
- Ronson C.W., Primrose S.B. (1979) J. Gen. Microbiol. V. 112, p. 77-88.
- Rosendahl L., Dilworth M.J., Glenn A.R. (1992) J. Plant Physiol. V. 139, p. 635-638.
- Rosbach S., Hennecke H. (1991) Mol. Microbiol. V. 5, p. 39-47.
- Ryan E., Bodley F., Fottrell P.F. (1972) Phytochem. V. 11, p. 957-963.
- Salminen S.O., Streeter J.G. (1986) Plant Physiol. V. 81, p. 538-541.
- Salminen S.O., Streeter J.G. (1987a) Plant Physiol. V. 83, p. 535-540.
- Salminen S.O., Streeter J.G. (1987b) J. Bacteriol. V. 169, p. 495-499.
- Salminen S.O., Streeter J.G. (1990) J. Gen. Microbiol. V. 136, p. 2119-2126.
- Salminen S.O., Streeter J.G. (1992) Plant Physiol. V. 100, p. 597-604.
- SanFrancisco M.J.D., Jacobson G.R. (1985) J. Gen. Microbiol. V. 131, p. 765-773.
- Saroso S., Dilworth M.J., Glenn A.R. (1986) J. Gen. Microbiol. V. 132, p. 243-249.
- Senior P.J., Beech G.A., Ritchie G.A.F., Dawes E.A. (1972) Biochem. J. V. 128, p. 1193-1201.
- Senior P.J., Dawes E.A. (1971) Biochem. J. V. 125, p. 55-66.
- Shatters R.G., Kahn M.L. (1989) J. Mol. Evolution. V. 29, p. 422-428.
- Shatters R.G., Liu Y., Kahn M.L. (1993) J. Biol. Chem. V. 268, p. 1-7.
- Shatters R.G., Somerville J.E., Kahn M.L. (1989) J. Bacteriol. V. 171, p. 5087-5094.
- Sik T., Barabas I. (1977) In: W. Newton, J.R. Postgate, C. Rodriguez Barrueco (eds.). Recent Developments in Nitrogen Fixation, Academic Press, London, p. 365-373.
- Simpson F.B., Maier R.J., Evans H.J. (1979) Arch. Microbiol. V. 123, p. 1-8.
- Skot L., Egsgaard H. (1984) Planta. V. 161, p. 32-36.
- Smith M.T., Emerich D.W. (1993) Arch. Biochem. Biophys. V. 304, p. 379-385.
- Smith M.T., Preston G.G., Emerich D.W. (1994) Symbiosis. V. 17, p. 33-42.
- Snapp S.S., Vance C.P. (1986) Plant Physiol. V. 82, p. 390-395.
- Somerville J.E., Shatters R.G., Kahn M.L. (1989) J. Bacteriol. V. 171, p. 5079-5086.
- Stam H., van Verseveld H.W., de Vries W., Stouthamer A.H. (1986) FEMS Microbiol. Lett. V. 35, p. 215-220.
- Stanier R.Y., Ornston L.N. (1973) Adv. Microbiol. Physiol. V. 9, p. 89-151.
- Stanley J., van Slooten J., Dowling D.N., Finan T., Broughton W.J. (1989) Mol. Gen. Genet. V. 217, p. 528-532.
- Stovall I., Cole M. (1978) Plant Physiol. V. 61, p. 787-790.

- Stowers M.D., Elkan G.H. (1983) *Can. J. Microbiol.* V. 29, p. 398-406.
- Streeter J.G. (1980) *Plant Physiol.* V. 66, p. 471-476.
- Streeter J.G. (1982) *Planta.* V. 155, p. 112-115.
- Streeter J.G. (1987) *Plant Physiol.* V. 85, p. 768-773.
- Streeter J.G. (1991) *Adv. Bot. Res.* V. 18, p. 129-187.
- Streeter J.G., Bosler M.E. (1976) *Plant Sci. Letts.* V. 7, p. 321-329.
- Streeter J.G., DeVine P.J. (1983) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 46, p. 521-524.
- Streeter J.G., Peters N.K., Salminen S.O., Pladys D., Zhaohua P. (1995) *Plant Physiol.* V. 107, p. 857-864.
- Streeter J.G., Salminen S.O. (1990) *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* V. 1035, p. 257-265.
- Streeter J.G., Salminen S.O. (1993) *Plant Physiol. Biochem.* V. 31, p. 73-79.
- Streeter J.G., Salminen S.O., Whitmoyer R.E., Carlson R.W. (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 58, p. 607-613.
- Stripf R., Werner D. (1978) *Z. Naturforsch.* V. 33c, p. 373-381.
- Stumpf D.K., Burris R.H. (1979) *Anal. Biochem.* V. 95, p. 311-315.
- Suganuma N., Yamamoto Y. (1987) *Soil Sci. Plant Nutr.* V. 33, p. 79-91.
- Szeto W.W., Nixon B.T., Ronson C.W., Ausubel F.M. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 1423-1432.
- Tabita F.R. (1988) *Microbiol. Rev.* V. 52, p. 155-189.
- Taboada H., Encarnacion S., Vargas M.C., Mora Y., Romero-Martinez E., Mora J. (1996) *Int. J. System. Bacteriol.* V. 46, p. 485-491.
- Tajima S., Kouzai K. (1989) *Plant Cell Physiol.* V. 30, p. 589-593.
- Tajima S., LaRue T.A. (1982) *Plant Physiol.* V. 70, p. 388-392.
- Thayer J.R., Huffaker R.C. (1982) *J. Bacteriol.* V. 149, p. 198-202.
- Thomashow M.F., Hugly S., Buchholz W.G., Thomashow L.S. (1986) *Science.* V. 231, p. 616-618.
- Trinchant J.C., Rigaud J. (1990) *Plant Physiol.* V. 94, p. 1002-1008.
- Trinchant J.C., Birot A.M., Rigaud J. (1981) *J. Gen. Microbiol.* V. 125, p. 159-165.
- Triplett E.W., Blevins D.G. (1979) *Plant Physiol.* V. 63 (Suppl), p. 113.
- Tyerman S.D., Whitehead L.F., Day D.A. (1995) *Nature.* V. 378, p. 629-632.
- Ucker D.S., Signer E. (1978) *J. Bacteriol.* V. 136, p. 1197-1200.
- Udvardi M.K., Day D.A. (1997) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* V. 48, p. 493-523.
- Udvardi M.K., Lister D.L., Day D.A. (1992) *J. Gen. Microbiol.* V. 138, p. 1019-1025.
- Udvardi M.K., Ou Yang L.-J., Young S., Day D.A. (1990) *Molec. Plant-Microbe Interact.* V. 3, p. 334-340.
- Udvardi M.K., Price G.D., Gresshoff P.M., Day D.A. (1988a) *FEBS Lett.* V. 231, p. 36-40.
- Udvardi M.K., Salom C.L., Day D.A. (1988b) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 1, p. 250-254.
- Van Straten J., Schmidt E.L. (1974) *Soil Biol. Biochem.* V. 6, p. 347-351.
- Vance C.P., Stade S., Maxwell C.A. (1983) *Plant Physiol.* V. 72, p. 469-473.
- Vanlerberghe G.C., Turpin D.H. (1990) *Plant Physiol.* V. 94, p. 1124-1130.
- Watson R.J., Chan Y.-K., Whcatcroft R., Yang A.-F., Han S. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 927-934.
- Watson R.J., Rastogi V.K., Chan Y.-K. (1993) *J. Gen. Microbiol.* V. 139, p. 1315-1323.
- Werner D., Dittrich W., Thierfelder H. (1982) *Z. Naturforsch.* V. 37c, p. 921-926.
- Werner D., Stript C.R. (1978) *Z. Naturforsch.* V. 33c, p. 245-252.
- Wickremasinghe R.L., Swain T., Goldstein J.L. (1963) *Nature.* V. 199, p. 1302-1303.
- Wong C.M., Dilworth M.J., Glenn A.R. (1991) *Arch. Microbiol.* V. 156, p. 385-391.
- Wong C.M., Dilworth M.J., Glenn A.R. (1994) *Microbiol.* V. 140, p. 2775-2786.
- Wong P., Evans H.J., Klucas R., Russell S. (1971) *Plant and Soil*, special volume, p. 525-543.
- Wong P.P., Evans H.J. (1971) *Plant Physiol.* V. 47, p. 750-755.
- Zhu Y.X., Shearer G., Kohl D.H. (1992) *Plant Physiol.* V. 98, p. 1020-1028.

Эволюционные аспекты симбиотических адаптаций: вклад *Rhizobium* в эволюцию ассоциации

Квиспел А.

I.	Введение.....	519
II.	Эволюция симбиоза: от неустойчивых ассоциаций к эндоцитозу.....	520
	II.A. Ассоциация→эктосимбиоз→эндосимбиоз.....	520
	II.A.1. Колонизация корней.....	520
	II.A.2. Адгезия на поверхности растений.....	521
	II.A.3. Процесс инфекции.....	522
	II.A.4. От инфекции к внутриклеточному симбиозу.....	525
	II.B. Широко специфичные→узкоспецифичные ассоциации.....	526
	II.C. Паразитарные→мутуалистические ассоциации.....	526
	II.D. Факультативная→облигатная зависимость от ассоциации.....	527
III.	Эволюция симбиоза: симбиосомы и органеллы.....	528
	III.A. Свойства и функции симбиосомы.....	529
	III.A.1. Фиксация азота.....	529
	III.A.2. Ассимиляция аммония.....	530
	III.A.3. Двухкомпонентные регуляторные системы.....	531
	III.A.4. Микроокружение бактериоидов в симбиосоме.....	531
	III.A.5. Сравнение с другими симбиотическими ассоциациями.....	532
	III.B. От симбиосомы к органелле.....	533
	III.B.1. Симбиогенные органеллы.....	533
	III.B.2. Организация генов в симбиосомах и органеллах.....	534
IV.	Общие выводы и заключительные замечания.....	534
V.	Литература.....	535

I. Введение

Симбиозы растений с азотфиксирующими бактериями, в первую очередь с представителями сем. Rhizobiaceae, относятся к числу наиболее изученных. Это в значительной степени связано с высокой практической значимостью азотфиксации. С другой стороны, эти симбиозы интересны как пример специализированных взаимодействий, связанных с глубокими физиологическими адаптациями. Их изучение может внести важный вклад в понимание природы растительно-микробных отношений и их роли в биосфере.

Понятие “симбиоза” как феномена совместной жизни разных организмов было впервые предложено швейцарским ботаником А. Де Бари в 1879 г. Впоследствии это понятие наполнялось различными значениями. Поскольку А. Де Бари не говорил о природе “совместной жизни”, исходно понятие симбиоза включало как паразитизм, так и мутуализм, однако позднее оно было сужено до мутуалистических отношений. В то же время, последующие работы показали условность различий мутуализма и антагонизма.

К настоящему времени установлено, что симбиотические ассоциации с более или менее выраженным характером мутуализма представляют одну из основных форм существования жизни. В недавно опубликованной исторической работе (Sapp, 1994) проанализированы различные подходы к изучению роли симбиоза в эволюции живого. Хотя многие ученые говорили о роли симбиоза в эволюции высших организмов, их аргументы долгое время не представлялись убедительными. В то же время, недавно полученные молекулярные данные об организации митохондрий и пластид показывают, что они возникли из α -протеобактерий и цианобактерий, соответственно. Имеются и более смелые предположения о симбиогенном происхождении эукариотической клетки (Margulis, 1993).

Прогресс в изучении молекулярных аспектов симбиоза был достигнут после того, как стало понятным, что симбиоз может служить механизмом, который обусловил приобретение эукариотическими организмами многих метаболических функций, характерных для прокариот (Douglas, 1994). Симбиогенез митохондрий и хлоропластов обеспечил способность к дыханию и фотосинтезу, тогда как симбиоз с бактериями сем. Rhizobiaceae позволил бобовым растениям использовать экологические возможности, связанные с азотфиксацией. В случае митохондрий и хлоропластов симбиоз возник достаточно давно, тогда как эволюцию симбиоза бобовых с ризобиями можно изучать в настоящее время.

II. Эволюция симбиоза: от неустойчивых ассоциаций к эндоцитозу

При рассмотрении эволюции симбиозов мы должны осознавать, что можем изучать эти ассоциации только у современных организмов. Лишь в очень немногих случаях, например в случае микоризы, мы имеем палеонтологический материал, анализ которого показал, что этот симбиоз возник 350–450 млн. лет назад, что совпадает со временем происхождения наземных растений (Remy et al., 1994) и намного предшествует возникновению бобовых (поздний Меловой период). В Плейстоценовых остатках были обнаружены корни актиноризовых растений с клубеньками, имеющих характерные кластеры гиф и везикул (Baker, Miller, 1980). Для клубеньков бобовых такие остатки пока отсутствуют. В литературе широко обсуждается связь филогении бобовых растений и их симбионтов (Sprent, Raven, 1985; Sprent, 1994; Young, 1996).

Даже при наличии ископаемых остатков имеется возможность проследить эволюцию морфологических структур, связанных с симбиозом, но не его физиологических или молекулярных механизмов. Изучение последовательности онтогенетических событий в высокоразвитых симбиотических системах позволяет судить о современных результатах физиологической и молекулярной эволюции. Логично предположить, что подобные этапы были характерны и для эволюции симбиоза, хотя необходимо учитывать то, что стадии онтогенеза и филогенеза не всегда идентичны. Более обоснованные выводы могут быть сделаны путем сравнения с другими, менее продвинутыми симбиозами. Такие исследования, которые можно охарактеризовать как “сравнительную симбионтологию”, будут полезными для выяснения основных эволюционных тенденций, таких как: ассоциация→эктосимбиоз→эндосимбиоз, широко специфичные→узкоспецифичные симбиозы, паразитические→мутуалистические симбиозы, факультативная→облигатная зависимость организмов от симбиоза.

II.A. АССОЦИАЦИЯ→ЭКТОСИМБИОЗ→ЭНДОСИМБИОЗ

II.A.I. Колонизация корней

Бактерии сем. Rhizobiaceae являются компонентами микробных сообществ почвы, в которой они подвергаются действию различных биотических и абиотических факторов, влияющих на популяционную динамику и на симбиотические свойства (Laguerre et al., 1993; Sullivan, 1996). Корневые эксудаты оказывают значительное влияние на микробные популяции, изменяя pH, концентрацию кислорода, использование питательных веществ, а также влияя на количество органики и некоторых газов, например, углекислоты и ацетилена (глава 8). В микробных популяциях

происходит отбор по реакции на условия прикорневой зоны и почвы (Lynch, 1990; de Weger et al., 1995). Результатом изменения популяционной структуры является влияние на межорганизменные отношения за счет конкуренции за питательные субстраты, продукции антибиотиков и изменения состава микробного сообщества.

Некоторые органические вещества оказывают хемотактическое действие на почвенные бактерии. Для Rhizobiaceae аттрактантами являются дикрабоновые кислоты, глутамат и аспартат. Флавоноиды, играющие важную сигнальную роль на более поздних стадиях взаимодействия, либо неактивны, либо вызывают хемотаксис бактерий посредством других типов рецепторов (Barbour et al., 1991; Dharmatilake, Bauer, 1992). Это показывает, что генетический контроль хемотаксиса и инфекции различен. Мутанты с нарушенной подвижностью обычно сохраняют вирулентность, но имеют пониженную конкурентоспособность по отношению к подвижным штаммам, что может снижать их экологическую приспособленность.

Для многих бактерий, обитающих в ризосфере, хемотаксис и прикрепление к корням завершают взаимодействие с растением. Для эндосимбионтов растений, таких как *Rhizobium*, *Frankia* или микоризные грибы, это только первые этапы в цепи событий, завершающихся формированием симбиоза. Формирование эндосимбиоза оказывает обратное влияние на судьбу популяции свободживущих микробов. Если симбионты оказывают положительное воздействие на растение (например, посредством азотфиксации), улучшение роста растений сопровождается возрастанием количества корневых эксудатов. Кроме того, те бактерии, которые находятся в клубеньках, но не дифференцируются в бактериоиды, после отмирания клубеньков выходят в почву, увеличивая численность популяции (Jimenez, Casadesus, 1989; Olivieri, Frank, 1994).

Таким образом, ризосфера является экологической нишей для предпочтительного размножения различных бактерий. Приспособленность к существованию в этой нише повышает шансы микроорганизма на выживание. Однако ризосфера мало защищает микробов от действия неблагоприятных факторов среды (вымывание током воды, действие антибиотиков, поедание хищными простейшими и т.д.). Поэтому наибольшей селективной ценностью будут обладать те экологические ниши, которые более надежно защищают своих обитателей.

II.A.2. Адгезия на поверхности растений

Повышенная защищенность от вымывания из ризосферы достигается за счет адгезии микробных клеток на поверхности корней. Адгезия может способствовать концентрации бактерий в сайтах инфекции. Адгезия характерна для всех бактерий и не связана с симбиозом специфически: она наблюдается при образовании малоспецифичных ассоциаций с корнями, а также и на поверхности почвенных частиц.

Адгезия определяется поверхностными белками и полисахаридами. Эти молекулы ответственны за все параметры адгезии, включая ее специфичность и прочность (Williams, Fletcher, 1996). Имеются многочисленные примеры двухступенчатого связывания: малоспецифичное, непрочное связывание на первом этапе взаимодействия дополняется более прочным связыванием на втором этапе. Эти процессы характерны для взаимодействия *Azospirillum* с корнями пшеницы (Michiels et al., 1991) и активно изучаются для взаимодействия агробактерий и ризобий с растительными клетками (Kijne, 1992; глава II). Возможно, что становление способности к связыванию, обусловленному варьирующими компонентами клеточной стенки, не составляло отдельного этапа в эволюции эндосимбиоза. Его можно рассматривать как выбор различных возможностей для взаимодействия с бактериями, содержащими особые белки, такие как рикадгезин, а также полисахариды (ЭПС, ЛПС), целлюлозные фибриллы, фимбрии или лектины. Однако это относится уже ко второму этапу, результатом которого может быть достаточно специфичное микробно-растительное взаимодействие. В паразитарных системах этот тип связывания может определять совместимость или реакцию гиперчувствительности, ведущую к несовместимости (Sequiera et al., 1977). Мутации в генах, кодирующих синтез поверхностных полисахаридов ризобий, могут нарушать последующее развитие инфекции и клубеньков (разд. II.A.4.). Связывание лектинов с этими полисахаридами может влиять на инфекционный процесс (Diaz et al., 1995; van Eysden et al., 1995). Некоторые аспекты взаимодействия могут иметь важное значение для дальнейшей эволюции симбиоза. В тех

симбиозах, для которых не характерен сложный морфогенез, следующий за клеточной адгезией, она может не иметь большой селективной значимости. Однако, если за адгезией следуют инфекционные процессы, ее эволюционное значение может быть более существенным и обуславливать обратную связь партнеров в процессе отбора.

II.A.3. Процесс инфекции

Еще лучшая защита от влияний окружающей среды достигается при проникновении бактерий внутрь хозяина. Эндосимбиотический тип существования обеспечивает также наилучшее снабжение микросимбионта питательными веществами, хотя и предопределяет необходимость диалога с защитными системами хозяина.

Переход бактерий из ризосферы в межклеточные пространства или внутрь клеток наружного кортекса не ограничен эктосимбиозом, эндосимбиозом и паразитизмом, но является общей чертой многих ризосферных ассоциаций. Уже в ранних работах (Dobereiner, Day, 1976) было показано, что диазотрофные бактерии ризосферы могут достаточно легко переходить в наружный кортекс. Оказалось, что ризосферные бактерии *Azospirillum* могут проникать в отмершие растительные клетки, а иногда, используя пектолитические ферменты, и в живые клетки. Наиболее убедительные данные получены для злака *Leptochloa fusca* (L.) Kunth, в корнях которого выявлены агломераты бактерий *Azoarcus*, которые часто проникают в клетки (Hurek et al., 1991).

Клубеньковые бактерии могут инфицировать корни различными путями (Sprent, de Faria, 1987; Kijne, 1992), которые варьируют от самого простого – через разрывы эпидермиса до наиболее сложного – путем формирования инфекционных нитей (глава 22). Наиболее простые механизмы проникновения могут быть связаны с действием литических ферментов как самих бактерий, так и растения. Формирование инфекционной нити является гораздо более высоко организованным морфогенезом. С использованием компьютерных моделей было показано, что рост инфекционной нити представляет собой процесс, обратный росту кончика корневого волоска (Batenburg et al., 1986; Kijne, 1992; глава 11). В то же время, имеется мало аргументов в пользу того, что более высоко организованные типы инфекции являются экологически более продвинутыми, так как все типы могут приводить к высокому уровню азотфиксации, и таким образом обладать одинаковой селективной ценностью.

Вопрос о том, почему одни бактерии проникают в клетки хозяина, а другие остаются в ризосфере, относится к числу общих проблем патогенеза растений и животных. Известно, что инвазия клеток животных патогенами, например энтеробактериями, происходит за счет выделения ими определенных белков. Эти белки взаимодействуют с рецепторами, связанными с цитоскелетом или иницилирующими каскадную передачу сигнала, вызывающую перестройку цитоскелета. Гены, контролирующие инвазию, имеются у многих патогенов растений и животных (Ochman, Groisman, 1995). Их структура и организация весьма консервативны, а филогенетическое распространение свидетельствует о независимом происхождении у патогенов растений и животных, а может быть и о возможности горизонтального переноса генов.

***nod*-гены и Nod-факторы.** Последовательность событий, приводящих к развитию инфекционной нити и формированию клубеньков, начинается в ризосфере, так как здесь происходит индукция бактериальных *nod*-генов, кодирующих синтез Nod-факторов – сигналов для развития симбиоза (Denarie, Cullimore, 1993; Spaink, 1995; главы 19, 20, 21). Первой реакцией, наблюдаемой при обработке корней Nod-факторами, является деполяризация мембраны корневых волосков (Ehrhardt et al., 1992). Однако эта реакция не является специфичной: она наблюдается при обработке корней “гетерологичными” (не образующими у данного растения клубеньков) видами ризобий, а также при инокуляции корней *Azospirillum* (Bashan, Levany, 1991). В то же время, действие Nod-факторов вызывает и дальнейшие реакции, связанные с деформацией корневых волосков, формированием инфекционных нитей, индукцией клубеньковых меристем и синтезом ранних нодулинов. Поэтому индукция *nod*-генов является критическим этапом, на котором из ризосферной популяции выбираются бактерии, способные подготовить растительные клетки для последующего развития симбиоза.

В связи с этим важно понять, почему бактерии содержат *nod*-гены, функции которых состоят только в подготовке инфекции и которые индуцируются лишь под специфическим воздействием корней. Данные о том, что Nod-факторы необходимы для жизнедеятельности свободноживущих бактерий, отсутствуют. Однако, продукты *nod*-генов имеют гомологов среди белков с хорошо известными функциями. Олигосахаридная часть Nod-факторов сходна с некоторыми структурными полисахаридами бактериальной клеточной стенки. Формирование этой структуры, а также ее модификация, необходимая для проявления функций хозяйской специфичности, осуществляется ферментами, которые участвуют в синтезе важных мембранных компонентов, таких как фосфолипиды (Geiger et al., 1994; глава 4).

К сожалению, в настоящее время отсутствуют данные о генетических системах, обеспечивающих инфекцию при образовании актиноризы или микоризы. В то же время, олигосахариды у патогенов могут играть роль элиситоров (Ryan, Farmer, 1991). Олигомеры хитина могут быть элиситорами фитоалексинов у риса (Ren, West, 1992). У *Azospirillum* были выявлены гомологи некоторых *nod*-генов — *nodP*, *nodQ*, *nodG* (Elmerich et al., 1991). Продукты первых двух генов являются субъединицами АТФ-сульфуриказы, а продукт третьего гена гомологичен дегидрогеназам и функционирует как β-кетоацилредуктаза. Однако, эти ферменты могут участвовать в биосинтетических процессах, не связанных с синтезом Nod-факторов.

Можно предположить, что свободноживущие предки ризобий имели энзиматические функции, связанные с синтезом олигомеров хитина или фосфолипидов. Соответствующие гены могли вовлекаться в эволюцию способности синтезировать Nod-факторы. Важным аспектом этой эволюции была реорганизация генов, которая привела к формированию новых *nod*-оперонов, находящихся в хромосоме или на плазидах, которые могли обеспечивать перенос этих генов. У многих ризобий *nod*-опероны имеют особые промоторные последовательности *nod-box*. Сравнение различных видов ризобий позволило выявить как консервативные, так и специфические элементы регуляции *nod*-генов (Schlaman et al., 1992; глава 19). Эти сравнения свидетельствуют об общем происхождении системы *nod*-генов, а также о ее специфической дивергенции.

Регуляция *nod*-генов. Синтез Nod-факторов не смог бы сыграть существенной роли в эволюции симбиоза, если бы отсутствовала система индукции *nod*-генов. Большинство из них находятся под контролем гена *nodD*, присутствующего в количестве 1-3 аллелей на геном. Например, у *R. meliloti* регуляция *nod*-генов осуществляется белками NodD1, NodD2 и NodD3, синтез которых регулируется транскрипционным активатором *SyrM* и шаперон-подобными белками *GroEL* (Denarie et al., 1993; глава 19).

Анализ аминокислотных последовательностей белков NodD показал, что они, как и белок *SyrM*, принадлежат к семейству LysR-подобных регуляторов транскрипции (Schell, 1993). Анализ дендрограмм аминокислотных последовательностей показал, что белки NodD образуют отдельную группу в этом семействе, тогда как белок *SyrM* в эту группу не входит (Rushing et al., 1991; Schlaman et al., 1992). Таким образом, выделение группы NodD-белков произошло на ранних стадиях эволюции семейства LysR-подобных регуляторов, а дивергенция разных аллелей гена *nodD* проходила гораздо позднее. Учитывая ключевую роль NodD в регуляции вирулентности ризобий, необходимо предположить, что возникновение этого белка явилось ключевым событием в эволюции симбиотической системы. Возможно, что именно оно обеспечило переход нестойких поверхностных ассоциаций в эктосимбиоз, а затем и в эндосимбиоз. Такой переход обозначил выделение ризобий среди других бактерий, которые проникают в ткани растения за счет действия менее специфичных механизмов, или остаются вне растения. Очевидно, что эволюция генов, кодирующих белки NodD, была эффективной лишь как коэволюция с генами, необходимыми для специфичного узнавания последовательностей ДНК (Goethals et al., 1992).

Флавоноиды растений и другие регуляторные сигналы. Обычно регуляторная функция NodD проявляется во взаимодействии со специфичными растительными флавоноидами (Schlaman et al., 1992; глава 19): одни из них индуцируют, а другие подавляют активность NodD. При наличии нескольких копий гена *nodD* реакция их продуктов на разные флавоноиды может быть различной. В некоторых случаях связывание NodD с последовательностью *nod-box* возможно в отсутствие флавоноидов — например, в случае белка NodD3 *R. meliloti* (Maillet et al., 1990) или искусственно

полученного гибридного варианта NodD (Spaink et al., 1989). Изучение структурной основы этих эффектов показало высокую специфичность растительных флавоноидов по отношению к белкам NodD. Однако, при этом наблюдаются не простые взаимодействия типа "ген-на-ген", а более сложные реакции на смесь флавоноидов.

Биологические эффекты флавоноидов изучены достаточно подробно. Фенольные вещества регулируют экспрессию генов при различных растительно-микробных взаимодействиях, а также на многих этапах растительного метаболизма (Peters, Verma, 1990; Koes et al., 1994). Флавоноиды обеспечивают хемотаксис многих почвенных организмов по отношению к корням, а также прорастание спор микоризных грибов (Siquiera et al., 1991; Becard et al., 1992). Было проведено сопоставление эффекта флавоноидов на индукцию *nod*-генов у *Bradyrhizobium* и их действие на хемотаксис гиф, прорастающих из спор микоризных грибов *Glomus* (Kape et al., 1993). Циннамиковая и кумаровая кислоты являлись сильными хемотаксисными агентами для *Glomus*, но практически не влияли на экспрессию *nod*-генов, тогда как дайдзеин и гинестин обладали противоположным действием. Были сопоставлены также *nod*-индуцирующие флавоноиды и фитоалексины, выделяемые растениями в ответ на внедрение патогенов (Dakora et al., 1993a, 1996). Инокуляция люцерны штаммами *R. meliloti* индуцировала синтез изофлавоноидов, идентифицированных как аглюконы и гликозиды фитоалексинов медикарпина и конъюгированных форм его предшественника формонетина. Оказалось, что этот предшественник индуцирует *nod*-гены, тогда как медикарпин индуцируется как фитоалексин. Сходные результаты получены в опытах с фасолью, у которой инокуляция ризобиями вызывала синтез фитоалексина куместрола и его изофлавинового предшественника дайдзеина (Dakora et al., 1993b).

Хотя роль флавоноидов в растительно-микробном взаимодействии требует дальнейшего изучения, очевидно, что они влияют на различные регуляторные системы, стимулируя или ингибируя их. С эволюционной точки зрения важно, что зависимые от флавоноидов регуляторные системы в микробно-растительных взаимодействиях весьма сходны с регуляторными системами высших организмов. Было проведено сравнение лиганд-связывающих районов белка NodD и регуляторных белков позвоночных, обладающих двойной сенсорно-активаторной функцией и регулируемых стероидными и тироидными гормонами. Некоторые флавоноиды (куместрол и эстрадиол) одинаково хорошо связываются с гормон-рецепторными белками млекопитающих и с NodD (Gyorgypal, Kondorosi, 1991). Два участка NodD (63 и 37 аминокислотных остатков) имеют гомологию 45% и 36% с модулями рецепции эстрогенов. Таким образом, эти участки соответствуют лиганд-связывающим доменам ядерных рецепторов. Более того, этот модуль NodD на 46% гомологичен мембранному сенсорному сегменту белка VirA *A. tumefaciens*. Гомологии этих модулей свидетельствуют об их происхождении от общего предкового белка (Baker, 1991, 1994). Связь между эффектами флавоноидов и стероидов подтверждается возможностью связывания первых с рецепторами эстрогена (Martin et al., 1978). Стероидные гормоны растений — брассиностероиды, играющие важную роль в функционировании растительных мембран, выявлены и в перибактероидных мембранах (Hernandez, Cooke, 1996), а бактериальные гопаноиды характерны для эндоситных везикул *Frankia* (Berry, Kleemann, 1993).

Пока имеется очень мало данных об участии этих молекул в микробно-растительных взаимодействиях. Сигнальные молекулы, выявленные в актиноморфных клубеньках и повышающие выживаемость эндоситных форм некоторых штаммов *Frankia* в клубеньках ольхи, идентифицированы как тритерпеноид дипетракарпол (Quispel et al., 1989). Паразитическая стадия *Ustilago violaceae* индуцируется α -токоферолом (Castle, Day, 1984). Фенилпропаноиды и тритерпеноиды индуцируют образование гаусторий у паразитических цветковых растений (Riopel, Timko, 1992).

Таким образом, выявлено много существенных сходств регуляторных систем, в которых сигнальные молекулы (флавоноиды, стероиды) связываются с рецепторами и индуцируют их регуляторную активность. Такие системы участвуют в регуляции биосинтетических и морфогенетических процессов, а также в паразитарных и мутуалистических взаимодействиях (Ryan, Farmer, 1991; Bolter, 1995). Разнообразие химической структуры сигнальных молекул, а также рецепторных белков, связывание последних с промоторными последовательностями ДНК или со специальными операторными генами, участвующими в различных биохимических путях, несомненно, послужи-

до источником многочисленных возможностей для их адаптации к системам растительно-микробного взаимодействия.

II.A.4. От инфекции к внутриклеточному симбиозу

Хотя Nod-факторы индуцируют наиболее ранние стадии инфекции и образования клубеньков, это не значит, что остальные стадии происходят автоматически и что другие специфические факторы не могут определять их развитие. Детальный анализ роли Nod-факторов *R. meliloti* на различных стадиях инфекции показал (Ardourel et al., 1994), что их структурные особенности более важны для ранних стадий развития инфекционной нити, чем для онтогенетических реакций растений, таких как апикальный рост корневых волосков и дифференцировка кортикальных клеток. Выявлено большое количество мутантов (*Brady*)*Rhizobium*, дефектных по инфекционному процессу. В некоторых случаях эти нарушения связаны с изменениями структуры Nod-факторов, в других случаях — с нарушениями других бактериальных компонентов (глава 22). В большинстве случаев изменения касались структуры поверхностных олигосахаридов, играющих важную роль в межклеточных взаимодействиях, реакциях на внутреннюю среду растений и на их защитные реакции. У мутантов ризобий, дефектных по ЭПС или ЛПС, выявлены различные нарушения инфекционного процесса (Kijne, 1992; главы 6 и 7). Эти нарушения обычно наблюдают на ранних стадиях взаимодействия — от инициации инфекционной нити до выхода бактерий в растительную цитоплазму.

Возникновение клубеньковых меристем в кортексе корня является одним из результатов действия Nod-факторов. Деления клеток в кортексе гороха могут быть связаны с взаимодействием ауксинов, цитокининов и ранее неизвестного С-фактора из проводящих пучков (Libbenga et al., 1973). Позднее было показано, что Nod-факторы влияют на транспорт ауксинов, тогда как С-фактор представляет собой уридин (Smit et al., 1995). Nod-факторы, как и цитокинин, индуцируют деление кортикальных клеток (Bauer et al., 1996). Предполагается перекрывание путей биосинтеза липо-хито-олигосахаридов (LCO) и ауксинов как сигналов клеточных делений у табака, причем ауксины играют роль общих эффекторов (Rohrig et al., 1996). Роль олигосахаридов особенно интересна, так как они являются факторами нормального морфогенеза растений (Ryan, Farmer, 1991). Возможно, что LCO также представляют общие регуляторы морфогенеза у растений и животных (Spaink, 1996).

Весьма важна дифференцировка растительных клеток, которую определяет измененный спектр фитогормонов и сниженная концентрация кислорода. Она обеспечивает контакт растительных клеток с инфекционными нитями и переход бактерий в клетки. Этот процесс подробно описан в главе 22, и здесь мы рассмотрим лишь те аспекты, которые важны для понимания эволюции симбиоза. Эндоцитоз бактерий представляет собой конечную стадию взаимодействия, в результате которого бактерии окружаются перибактероидной мембраной (ПБМ). Первоначально она возникает из плазматической мембраны, а потом растет с участием структур эндоплазматического ретикулюма и аппарата Гольджи (Kijne, Planque, 1979; Mellor, 1989). Некоторые белки ПБМ, являются клубенек-специфическими нодулинами, синтез которых индуцируется на стадиях симбиоза, предшествующих эндоцитозу (Morrison, Verma, 1987).

После нескольких делений бактерии прекращают размножение и превращаются в бактериоиды, которые вместе с окружающей их ПБМ образуют симбиосому. На этой стадии симбиоза индукция *nod*-генов прекращается (Schlaman, 1991).

Многие эндофитные микроорганизмы окружены растительными мембранами, которые в общем случае называется перисимбиотическими — ПСМ (Smith, Smith, 1990). Они обеспечивают транспорт веществ между партнерами. При биотрофном паразитизме этот транспорт обычно является односторонним, тогда как при мутуализме он часто двусторонний. В некоторых симбиотических системах (арбускулярная микориза, актиномориза) ПСМ содержит молекулы растительного происхождения, сходные с компонентами клеточной стенки, и такие системы могут рассматриваться как эктосимбиозы. В случае симбиоза с ризобиями подобные компоненты выявлены для небобового *Parasponia*.

II.B. ШИРОКО СПЕЦИФИЧНЫЕ→УЗКОСПЕЦИФИЧНЫЕ АССОЦИАЦИИ

Некоторые штаммы ризобий образуют клубеньки у широкого круга растений, например, штамм 32Н1 *Bradyrhizobium* вступает в симбиоз даже с небобовым *Parasponia* (сем. *Ulmaceae*). Другие штаммы бактерий проявляют специфичность к определенным видам или даже сортам растений. Отражают ли данные различия разную степень экологической адаптации?

Взаимодействия ризобий с бобовыми являются многостадийными, причем ограничение каждой последующей стадии выражается в повышении специфичности. Многие ограничения связаны с варьированием структуры Nod-факторов и особенно с наличием радикалов-модификаторов, а также с ограничениями взаимодействия NodD с флавоноидами и ЭПС (ЛПС) с растительными лектинами (Díaz et al., 1989, 1995). Мутации по генам, участвующим в определении специфичности со стороны как растений, так и бактерий, может приводить к расширению или к сужению спектра хозяев.

Остается неясным, какое из состояний симбиоза является наиболее селективно ценным — широкоспецифичное или узкоспецифичное. Для выяснения этого вопроса важно сравнение родственных симбиозов (Gianinazzi-Pearson, 1996; Pawlowski, Bisseling, 1996). Обычно арбускулярную микоризу (АМ) рассматривают как пример неспецифичного симбиоза, характерного для всех покрытосемянных, однако после разработки методик культивирования отдельных штаммов АМ грибов может оказаться, что этот симбиоз более специфичен. Эндосимбиозы, образуемые *Nostoc* и *Anabaena*, считаются мало специфичными, так как описано инфицирование растений штаммами, выделенными из неродственных растений, а также свободноживущими цианобактериями. Однако, отсутствие перекрестной инокуляции между разными формами *Azolla* говорит о том, что необходима осторожность при рассмотрении выделяемых штаммов цианобактерий как симбиотических форм. Штаммы, являющиеся реальными эндофитами, должны быть более специфичными (Zimmerman et al., 1989).

Сходные проблемы возникают при анализе взаимодействия *Frankia* с *Alnus glutinosa* (Burggraaf, Valstar, 1984; Quispel, 1992). Эндофитные популяции, даже выделенные из одного клубенька, могут быть очень гетерогенными, варьируя по вирулентности, эффективности и способности формировать споры *in situ*. Интересные сравнения дало изучение микоризного симбиоза с разными грибами у монотрофных видов. Анализ филогении партнеров показал, что сужение симбиотической специфичности происходило только в эволюции микобионта (Cullings et al., 1996). Однако, специфичность, определяемая лишь односторонним отбором, может определяться эволюцией паразитических грибов, направленной не на оптимизацию распределения углерода, а на коэволюцию в системе взаимного отбора. Можно предположить, что в случае бобово-ризобиального симбиоза отбор был направлен на повышение азотфиксирующей активности, а не специфичности. Сужение спектра растений-хозяев могло быть вторичным результатом давления отбора, а не его стимулом.

II.C. ПАРАЗИТАРНЫЕ→МУТУАЛИСТИЧЕСКИЕ АССОЦИАЦИИ

Вопрос о соотношении мутуализма и антагонизма вызывает большие дискуссии, так как неясно, может ли мутуализм рассматриваться как результат наиболее продолжительной коэволюции. Трудность в разграничении этих ассоциаций проявляется при рассмотрении прокариотических паразитов растений (Long, Staskawicz, 1993) и привела к появлению терминов “рафинированные паразиты” (Djordjevic et al., 1987) и “симпатогенез” (Spaink, 1995). Разделение паразитизма и мутуализма зависит от наших знаний о разных типах межорганизменных взаимодействий, которые почти всегда представляют собой смесь синергических и антагонистических эффектов (Quispel, 1951). Действия, синергические в одном направлении, могут оказаться антагонистическими в другом. Эти сравнения осложняются тем, что биохимически сходные сигнальные взаимодействия в одних системах могут приводить к исключению паразита, а в других — к узнаванию симбионта.

Имеется ряд аналогий во взаимодействии ризобий и паразитических бактерий (грибов) с их хозяевами. Особенно интересны они в случае реакций гиперчувствительности, синтеза фитоалексинов и их элиситоров (Darvill, Albersheim, 1984; Kuc, 1995; Boller, 1995). Это же касается сопоставления флавоноидов, активирующих NodD, с фитоалексинами, а также хитиновых олигосахаридных Nod-факторов с элиситорами фитопатогенов (раздел II.A.3.).

Важно, что у бобовых основными фитоалексинами являются изофлавоноиды, такие как глицеолин сои или пизатин гороха. Инокуляция симбиотически активными штаммами *Bradyrhizobium* приводит к синтезу лишь небольших количеств глицеолина, но эти количества резко возрастают при инокуляции неvirulentными мутантами, дефектными по синтезу ЭПС (Parniske et al., 1994). Такие же результаты получены при инокуляции люцерны различными штаммами *R. meliloti* (Niehaus et al., 1994). Инокуляция красного клевера ЭПС-мутантами ризобий вызывает сильные защитные реакции после выхода бактерий из инфекционных нитей (Skorupska et al., 1995). У гороха роль пизатина проявляется в процессе старения клубеньков (van Iren et al., 1983). У люцерны Fix⁻ мутант *R. meliloti* индуцирует активный синтез халькон-синтазы (ключевой фермент финилпропаноидного пути) и более резкую защитную реакцию растений, чем штамм дикого типа (Grosskopf et al., 1993). Описан мутант *R. meliloti*, инокуляция которым люцерны приводит к абортации инфекционных нитей и симптомам некроза, напоминающим реакцию гиперчувствительности (Vasse et al., 1993). Однако, мутант *R. leguminosarum* bv. *trifolii* с нарушенным формированием инфекционных нитей не вызывал повышенной реакции гиперчувствительности (de Boer et al., 1995). Описано неэффективное взаимодействие сои с *Bradyrhizobium*, в процессе которого ранний распад ПБМ коррелировал с накоплением глицеолина (Werner et al., 1985). Возможно, что ПБМ защищает бактериоиды от защитных реакций растения (Bassarab, Werner, 1987). Предложена модель, в соответствии с которой Nod-факторы выполняют функции элиситоров, индуцируя хитолитические ферменты растений, которые подавляют дальнейший синтез Nod-факторов. Многие аспекты развития клубеньков могут рассматриваться как взаимодействие индуцирующих и репрессирующих активностей в симбиозах, которое приводит к развитию защитных реакций, вызывающих их старение.

Таким образом, граница между мутуализмом и антагонизмом в растительно-микробных взаимодействиях очень условна. Они представляют собой систему мультифункциональных возможностей, которые обеспечивают синтез элиситоров и флавоноидов, и даже небольшие изменения баланса этих процессов приводят к взаимному переходу мутуализма и антагонизма. Это обеспечивает и возможность эволюционных переходов между данными типами межорганизменных взаимодействий.

II.D. ФАКУЛЬТАТИВНАЯ→ОБЛИГАТНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ОТ АССОЦИАЦИИ

Термины “облигатный” и “факультативный” симбиоз широко используются для разграничения тех организмов, которые могут существовать как сапротрофы вне хозяев и которые не культивируются в свободноживущем состоянии. В последнем случае предполагается, что организм настолько адаптирован к внутренней среде хозяина, что не может существовать в других условиях, хотя на практике это может быть связано с отсутствием подходящей среды для культивирования. Более строгое определение облигатности требует проверки возможности существования микроорганизма в свободном состоянии в естественных условиях.

Если в реальности факультативное и облигатное состояния представляют собой две крайности эволюционного развития, можно предположить, что неспецифические поверхностные ассоциации должны быть, как правило, факультативными, а высокоспецифичные эндосимбиозы — облигатными. Однако, это не всегда согласуется с фактическими данными. С одной стороны, лишь 1-10% микроорганизмов из почвенных и ризосферных популяций культивируются на обычных лабораторных средах (Campbell, Greaves, 1990). С другой стороны, такие высокоспециализированные эндосимбионты как ризобии могут быть выделены из клубеньков и легко культивируются вне растения.

Проблема выделения эндосимбионтов не всегда связана с их сложными ротовыми потребностями. Она может быть обусловлена также понижением жизнеспособности под действием защитных систем хозяина. Многие данные показывают, что так называемые облигатные паразиты легко культивируются на простых средах после первого выделения из растений. В настоящее время актиномицеты из актиноризных клубеньков могут быть легко выделены и культивированы, хотя это относится не ко всем штаммам (Lechevalier, Lechevalier, 1990). Один из штаммов может быть выделен из клубеньков *Alnus glutinosa* только при добавлении растительного фактора, идентифицированного как тритерпеноид диптерокарпол. Для дальнейшего культивирования этот фактор несущественен, хотя жирные кислоты и оказывают стимулирующее влияние (Quispel et al., 1992). Подобные эффекты говорят о роли жирных кислот в обеспечении стабильности мембран в системах эндосимбиоза (Selim et al., 1996).

Данные о жизнеспособности бактериоидов ризобий, выделенных из клубеньков бобовых, противоречивы. В ранних работах было показано, что индивидуальные бактериоиды, выделенные из клубеньков гороха, люцерны и клевера, не способны размножаться на среде, используемой для культивирования исходных бактерий (Almon, 1933; Bergersen, 1974). Однако, бактериоиды могли быть повреждены при выделении. Более мягкие процедуры получения бактериоидов из мацерированных протопластов показали возможность культивирования 80-90% изолятов из подземного клевера и 60-70% изолятов из красного клевера (Gresshoff, Rolfe, 1978). Жизнеспособность бактериоидов, выделенных из сои, сильно варьирует в зависимости от их возраста и штамма бактерий (MacDermott et al., 1987). Таким образом, жизнеспособность изолятов, полученных из хозяина, может не отражать степень облигатности симбиоза. Строгая облигатность, связанная с генетически обусловленной неспособностью к самостоятельному существованию, не характерна для паразитических и муталистических симбионтов, в жизненном цикле которых присутствует стадия, необходимая для повторной инфекции. Облигатность наиболее характерна для тех микробов, которые способны пройти в хозяине все стадии своего жизненного цикла. Трудность выделения микроорганизмов может быть связана с их адаптацией к особым условиям питания, а также к действию защитных систем. Это говорит о необходимости осторожной интерпретации данных, хотя очевидно, что разные типы зависимости от хозяина имеют различные эволюционные последствия для микроорганизмов.

III. Эволюция симбиоза: симбиосомы и органеллы

Выше мы рассмотрели эволюцию симбиоза как результат завоевания микроорганизмами внутренней среды хозяина. Эта эволюция может быть результатом отбора в пользу мутаций микроорганизма, повышающих инфекционность, а также мутаций хозяина, ограничивающих инфекцию. Однако, в случае мутуализма такое объяснение эволюции не является достаточным. Например, эндомикоризные грибы и азотфиксирующие бактерии снабжают хозяев фосфором и азотом, получая взамен легко усвояемые источники питания. В этих случаях инфекция оказывается выгодной для хозяина, а стимуляция его роста, в свою очередь, улучшает питание эндосимбионта. Были предложены "альтруистические модели", в соответствии с которыми азотфиксирующие бактериоиды утрачивают жизнеспособность, однако обеспечивают улучшенное питание недифференцированных бактерий, находящихся в клубеньках (Jimenez, Casadesus, 1989) или в ризосфере (Olivieri, Frank, 1994).

Повышение зависимости партнеров друг от друга приводит к иному результату. Если в факультативных системах отбор действовал на каждого из партнеров по отдельности, то при облигатном симбиозе он действует на систему в целом. В отношении лишайников уже давно было показано, что они представляют собой не два организма, а один (Tobler, 1925). Это справедливо и для других специализированных симбиозов. В клубеньках бобовых новой биологической единицей может считаться симбиосома, которая состоит из азотфиксирующих бактериоидов, находящихся в особой экологической нише (перибактероидное пространство, окруженное специальной мембраной). Симбиосома является продуктом эволюции симбиоза, а высокая азотфиксирующая активность симбиосомы определяет дальнейшее направление его эволюции.

Таблица 1. Сравнение свободноживущих клубеньковых бактерий и бактериоидов

Признаки	Культивируемые бактерии	Бактериоиды
Форма	Небольшие палочки	Увеличены в размерах, разветвленные
Компоненты клеточных стенок ¹	ЛПС и белки	Количество ЛПС снижено, новые эпитопы в наружной мембране
Компоненты внутренней мембраны ²	Фосфо(липиды) и транспортные белки	Фосфолипиды и белки с измененными транспортными функциями
C-метаболизм ³	Путь Энтнера-Дудорова (ЭД) – основной, имеется цикл Кребса	Присутствуют ферменты пути ЭД (глюкоза не используется), высокая активность ферментов метаболизма дикарбоновых кислот
Дыхание ⁴	Цитохромы, цитохром-оксидазы, энергизация мембраны	Специальные цитохромы, адаптированные к низкой концентрации O ₂ , энергизация мембраны сопряжена с азотфиксацией
N-метаболизм ⁵	Нитрогеназная активность отсутствует, имеется GS-GOGAT	Нитрогеназная активность имеется, GS-GOGAT отсутствует
Транспортные системы ⁶	Активный транспорт глюкозы, дикарбоновых кислот и аммония	Очень активный транспорт дикарбоновых кислот, транспорт глюкозы и аммония отсутствует

¹Van Brussel et al., 1977; Brewin et al. (данный том); VandenBosch et al., 1989; ²Glazebrook et al., 1993; Roest et al., 1995;

³Bergersen, Turner, 1967; de Vriez et al., 1982; Stowers, 1985; MacKay et al., 1988; Day, Copeland, 1991; Finan et al., 1991; ⁴Laane et al., 1980; Appleby, 1974, 1984; ⁵Brown, Dilworth, 1975; Planque et al., 1978; Long, 1989; ⁶Laane et al., 1980; De Vriez et al., 1982; Quispel et al., 1984; O'Hara et al., 1985; Ronson, 1988; Udvardi et al., 1990.

III.A. СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ СИМБИОСОМЫ

Ключевые свойства свободноживущих и симбиотических форм ризобий сопоставлены в таблице 1, и здесь мы лишь кратко рассмотрим эволюционно значимые аспекты взаимной адаптации партнеров в симбиосоме. Очевидно, что свойства свободноживущих бактерий зависят от условий, и иногда при действии стрессов они превращаются в формы, подобные бактериоидам. Например, клетка штамма 32Н1, обладающего широким спектром хозяев, вне растения могут принимать форму бактериоидов и даже фиксировать азот (Pankhurst et al., 1978; van Brussel et al., 1979). Однако, степень их сходства с бактериоидами, находящимися в клубеньках, требует дополнительного изучения (Vasse et al., 1990). Данные, полученные при изучении изолированных бактериоидов, также необходимо рассматривать с осторожностью, так как они могут представлять разные стадии симбиоза. Кроме того, в процессе выделения свойства бактериоидов могут существенно меняться.

Бактериоиды и свободноживущие бактерии различаются по многим физиологическим свойствам, что связано с различной регуляцией активности их генов. Регуляторные аспекты симбиоза весьма важны в связи с приобретением растениями новой метаболической функции — возможности питаться атмосферным азотом.

III.A.1. Фиксация азота

У всех азотфиксирующих бактерий фиксация азота связана с индукцией генов *nifHDK*, кодирующих белки нитрогеназы, а также ряда дополнительных *nif*- и *fix*-генов, обеспечивающих созревание этого фермента, синтез кофакторов и регуляцию активности (Long, 1989; Merrick, 1993). Гены *nifHDK* консервативны для всех азотфиксаторов и очевидно имеют древнее происхождение. Достаточно консервативными являются и регуляторные системы *nifAL* и *ntrBC*, связанные с нитро-

геназной активностью. Наиболее важными для азотфиксации внешними факторами являются концентрации в среде связанного азота и молекулярного кислорода. У ризобий регуляция азотфиксации кислородом определяется другой двухкомпонентной регуляторной системой, *fixLJ*, а также чувствительностью к кислороду белка NifA (Fisher, Hennecke, 1987).

Хотя каскадная регуляция азотфиксации хорошо изучена (de Bruijn et al., 1990), до сих пор неясно, почему она у большинства ризобий осуществляется только в бактериоидах, для которых кислородная регуляция является доминирующим фактором. Практически все азотфиксаторы вынуждены решать “кислородный парадокс”, который заключается в необходимости кислорода, токсичного для нитрогеназы, для получения больших количеств энергии для азотфиксации. Решения могут быть различными и достигаются посредством биохимических и структурных механизмов. Многие ризосферные бактерии (например, *Azospirillum*), цианобактерии, *Frankia*, *Azorhizobium* (образует клубеньки на стеблях некоторых бобовых) могут фиксировать азот в свободноживущем состоянии при лимитации по связанному азоту. Штаммы *Bradyrhizobium* могут в определенных условиях фиксировать азот *ex planta*, но не используют его для диазотрофного роста (синтеза белка). Для *Rhizobium* достоверные данные об азотфиксации в чистой культуре отсутствуют, так что это свойство бактерий используется почти исключительно растениями.

До сих пор непонятно, как столь существенные различия между разными симбиотическими микроорганизмами возникли в ходе эволюции и каковы были обусловившие их селективные механизмы. В частности, неясно имели ли предки ризобий *nif*-гены и были ли эти гены активными до возникновения симбиоза. Возможно, что некоторые ризобии приобрели способность формировать клубеньки и фиксировать азот за счет переноса *sym*-плазмид. Однако тогда возникает вопрос: какое состояние *sym*-генов было исходным — плазмидное (*Rhizobium*) или хромосомное (*Bradyrhizobium*). Другой вопрос состоит в том, возникли ли *sym*-плазмиды из плазмид, содержавших гены, необходимые для инфицирования растений, например из плазмид агробактерий. С эволюционной точки зрения остается непонятным, какое селективное преимущество имело для бактерий ограничение способности фиксировать азот лишь симбиотическим состоянием. Можно предположить, что отсутствие азотфиксации у свободноживущих бактерий стимулировало корни растений, находящиеся в условиях дефицита азота, к тому, чтобы “разрешить” инфицирование ризобиями. В то же время, нельзя исключить и того, что различия между *Rhizobium* и *Azorhizobium* возникли в результате накопления случайно возникших мутаций.

III.A.2. Ассимиляция аммония

У всех азотфиксаторов первичным продуктом нитрогеназной реакции является аммоний. У свободноживущих бактерий, например у *Klebsiella*, аммоний усваивается посредством глутаминсинтетазы и глутаматсинтазы (цикл GS-GOGAT). При этом регуляция азотфиксации определяется концентрацией связанного азота в среде, который воздействует на Ntr-систему и на систему посттрансляционного аденилирования-деаденилирования. Все виды Rhizobiaceae имеют две глутаминсинтетазы: GSI бактериального типа и GSII растительного типа (Darrow et al., 1981; de Vries et al., 1983). Обсуждается возможность горизонтального переноса генов, кодирующих GSII, из растений в бактерии (Edmonds et al., 1987; Tsai, Benson, 1989). В то же время, не было обнаружено гомологии между кДНК GS *Phaseolus* и ризобий (Cullimore, Mifflin, 1983).

У всех эндосимбиотических (но не у свободноживущих) диазотрофов активность этих ферментов снижается при переходе к азотфиксации. У *Bradyrhizobium* индукция нитрогеназной активности *ex planta* возможна на среде с глутаматом (O’Gara, Shanmugam, 1976). При этом регуляторная система, состоящая из генов *glnA* (GSI) и *glnII* (GSII) связана с общей регуляторной системой Ntr (Amar et al., 1994), однако неясно, функционирует ли эта система в бактериоидах. GSI может присутствовать в бактериоидах в неактивной форме (Moreno et al., 1991). Активность гена *glnII* регулируется концентрацией кислорода (Adams, Chelm, 1988).

Таким образом, микроусловия внутри клубеньков определяют снижение или полную утрату ферментативных активностей, связанных с ассимиляцией аммония. Бактериоиды могут только фиксировать азот, но не использовать его для питания. В чистой культуре ризобии содержат пермеазу аммония, которая может обеспечивать его транспорт в клетки. Это показано многими авто-

рами с использованием метиламмония (аналог NH_4^+) и селективного электрода (O'Hara et al., 1985). В бактериоидах эта система отсутствует и возможен лишь пассивный транспорт аммония в соответствии с градиентом концентрации и pH, определяемым энергетическим статусом мембраны (Laane et al., 1980).

III.A.3. Двухкомпонентные регуляторные системы

Глюкоза является неэффективным субстратом для дыхания бактериоидов, которые используют в основном дикарбоновые кислоты (сукцинат и малат). Это связано главным образом с особенностями транспортных свойств мембран бактериоидов, а также ПБМ. Мутанты ризобий, дефектные по транспорту глюкозы, обычно сохраняют способность к симбиотической азотфиксации, тогда как мутанты по транспорту дикарбоновых кислот — утрачивают ее (Glenn, Brewin, 1981; Ronson et al., 1981). Поступление большого количества дикарбоновых кислот из растительных клеток определяет индукцию их транспорта и подавление транспорта глюкозы (de Vries et al., 1982).

Гены, контролирующие транспорт дикарбоновых кислот, были изучены первоначально у энтеробактерий, а позднее и у Rhizobiaceae (Ronson, 1988). Транспорт осуществляется белком, кодируемым геном *dctA*, активность которого регулируется генами *dctB* и *dctD*. Белки DctB и DctD образуют двухкомпонентную регуляторную систему, причем DctB является сенсором дикарбоновых кислот, а DctD регулирует транскрипцию *dctA*. Также как и другие двухкомпонентные системы (NtrBC, NifLA, FixLJ), система DctBD взаимодействует с промоторами, специфичными для сигма-54 субъединицы РНК-полимеразы. Мутации, нарушающие N-терминальный участок DctD, либо предотвращают активацию *dctA*, либо делают ее конститутивной. У штаммов, содержащих слияние *dctA-lacZ* на различном генетическом фоне, при мутациях по генам *dctB* или *dctD* наблюдали его экспрессию в бактериоидах, но не в свободноживущих клетках. Это показывает, что в бактериоидах может функционировать альтернативная регуляторная система. Структурное сходство DctD с NtrA показывает, что последний белок может быть регулятором не только *nif*-, но и *dct*-генов. Эта гипотеза согласуется с данными об участии белка NtrA в контроле *dct*-системы. Изучение этой системы затруднено возможностью перекрестной регуляции белками, входящими в другие системы (Birkenhead et al., 1990; Labes et al., 1993; Labes, Finan, 1993; Alloway et al., 1995). Возможность такой регуляции показана при изучении систем NodVW и NwsAB (Grob et al., 1994).

Логично предположить, что регуляторные системы, имеющие сходные домены, играли важную роль в эволюции микробно-растительного взаимодействия, которое привело к возникновению симбиосом. Возможность взаимодействия разных регуляторных систем и взаимозаменяемости их компонентов показала, что эти феномены могли играть важную роль в эволюции симбиоза (Labes, Finan, 1993). Первоначально предки ризобий являлись почвенными или ризосферными сапротрофами. В этих условиях *ntr*-система регулировала энергоемкий процесс азотфиксации в соответствии с наличием подвижных форм азота. Однако, в условиях ризосферы, где имеется повышенное количество дикарбоновых кислот, мог происходить отбор бактерий на более активное их усвоение. Возникновение эндوفитного образа жизни повлекло за собой эволюцию новых регуляторов, функционирующих в микроаэробных условиях, что привело к изменению вектора отбора. Важно отметить, что для этих адаптаций, по-видимому, было достаточным относительно небольшое количество изменений в уже существующих регуляторных системах.

Адаптация к микроаэрофильным условиям потребовала изменения путей переноса электронов. В бактериоидах синтезируются альтернативные цитохромы, благодаря которым дыхание может эффективно осуществляться при недостатке кислорода. В этих условиях активируется синтаза гема, кодируемая геном *hetA*, причем этот эффект нарушается у мутантов по генам *fixLJ* (Page, Guerinet, 1995). Таким образом, мы снова сталкиваемся с примером участия двухкомпонентной регуляторной системы в различных, но функционально связанных процессах.

III.A.4. Микроокружение бактериоидов в симбиосоме

Экологическая ниша бактериоидов представлена перибактероидным пространством, ограниченным ПБМ. Последняя выполняет две основные функции (Bassarab, Werner, 1987): 1) предохраняет бактериоиды от защитных реакций растительной клетки (разделы III.C и II.D), 2) обеспечи-

вает перенос молекул между микросимбионтами и растительной клеткой. Многие различия между бактериоидами и свободноживущими клетками могут быть связаны с действием литических ферментов растения (Mellor, 1989).

В переносе молекул между партнерами важную роль играют два фермента ПБМ: H^+ АТФ-аза и система транспорта дикарбоновых кислот (Blumwald et al., 1985; Day, Udvardi, 1992). Первый фермент функционирует как протонная помпа, которая снижает рН внутри симбиосомы, что может активировать транспорт дикарбоновых кислот и других веществ. Аммоний, секретируемый из симбиосом, может повышать рН в растительной цитоплазме. Это может приводить к усилению продукции дикарбоновых кислот (например, малата), что показано для растительных клеток (LaRue et al., 1983).

Для понимания механизмов взаимной адаптации партнеров важны данные не только об их метаболической активности, но и о регуляции транскрипции. При симбиозе усиливается синтез многих растительных белков. В случае GS это усиление может быть связано с индукцией субстратом (Sengupta-Gopalan, Pitas, 1986; Hirel et al., 1987). Другие белки, такие как легоглобин или выявленный в ПБМ нодулин N26, являются клубенек-специфичными. Поскольку наиболее важным регулятором нитрогеназной активности в симбиосомах является кислород, большое внимание привлекает индукция легоглобина (Appleby, 1974, 1984). Ранее считалось, что глобиновая часть этой молекулы синтезируется растением, а гемовая бактерией, однако позднее было показано, что оба компонента образуются в растительной клетке (O'Brian, 1996).

III.A.5. Сравнение с другими симбиотическими ассоциациями

Рассмотренные данные показали, что симбиосома, образуемая при эффективном бобово-ризобийном симбиозе, является продуктом ряда взаимовыгодных взаимодействий, в которых участвуют структурные и регуляторные гены. Возникает вопрос: выполняли эти гены какую-либо функцию в несимбиотических системах или они возникли при эволюции симбиоза. Ответ на этот вопрос будет получен в ходе дальнейшего изучения бобово-ризобийного симбиоза, а также его сравнения с другими симбиотическими системами.

Ключевым вопросом представляется изучение ПБМ. Во многих мутуалистических системах эндифиты окружены цитоплазматическими мембранами, происходящими в основном из мембран хозяина (Smith, Smith, 1990). Большинство этих мембран содержит H^+ АТФ-азу, которая отсутствует у эндопаразитов. Это может быть связано с тем, что при мутуалистическом симбиозе обмен метаболитами часто является двусторонним. Важно, что индукция генов хозяина не ограничена нодулинами, поскольку в микоризованных корнях синтезируются "микоризины" (Wyss et al., 1990). У сои обнаружен микоризин, гомологичный белку N26, выявленному в ПБМ. Дальнейшие работы позволят уточнить степень сходства нодулинов и микоризинов. Однако в любом случае очевидно, что индукция генов растения под действием эндосимбионта — общее явление. Индукция легоглобина не ограничена бобовыми: он выявлен у *Parasponia* (сем. Ulmaceae) при инокуляции ризобиями. В актиноризных клубеньках легоглобин был впервые обнаружен у *Casuarina* и *Myrica*, однако по мере совершенствования методов его удалось выявить у *Alnus glutinosa* (Suharjo, Tjerkema, 1995). Повышенное количество легоглобина у *Casuarina* и *Myrica* может быть связано с отсутствием везикул, толстые стенки которых предохраняют нитрогеназу от кислорода. В клубеньках, содержащих типичные везикулы, регуляция кислорода посредством легоглобина может иметь меньшее значение. Вызывает сомнение то, что у *Alnus glutinosa* небольшое количество легоглобина может быть достаточным для регуляции уровня кислорода. Исходное предположение о том, что способность к синтезу легоглобина у небобовых связана с горизонтальным переносом генов, маловероятно. Выявление легоглобина у злаков (Tjerkema, Asa, 1987) говорит о том, что подобные белки широко распространены у растений и могут выполнять функции, связанные с транспортом кислорода или с определением его концентрации.

Наиболее важным аспектом изучения симбиосом бобовых является индукция нитрогеназной активности в связи с репрессией ассимиляции аммония. Сравнение с другими эндосимбиозами показало, что этот механизм имеет общее значение: стимуляция первичных ассимиляционных процессов и репрессия более поздних реакций широко распространены. Во всех симбиозах с азотфик-

сирующими микробами (цианобактерии, *Frankia*), в эндоситных клетках стимулируется нитрогеназа и репрессируется GS-GOGAT, что связано с экспортом аммония в клетки хозяина (Huss-Danell, 1990; Bergman et al., 1992; Silvester et al., 1996). При симбиозе с фототрофными цианобактериями или с эукариотическими водорослями животные или грибы могут приобретать фотосинтетическую активность. В случае лишайников водоросли *Trebouxia* способны к автотрофному росту в чистой культуре, а также к фотосинтезу в талломе гриба (Quispel, 1959). Передача первичных продуктов фотосинтеза в клетки партнера показана для лишайников (Richardson, 1968; Galun, Bubrick, 1984), гидры (Mews, 1980) и кораллов (Muscantine et al., 1972). Как и в случае симбиоза с азотфиксаторами, этот перенос стимулируется низкими значениями pH, обусловленными действием H^+ АТФ-азы в перисимбиотических мембранах, которые функционируют как протонная помпа по отношению к микроокружению эндосимбионта.

Несмотря на специфические различия, принципы регуляции метаболизма и транспорта в эндосимбиозах основаны на общих свойствах мембран. Дальнейшие эволюционные адаптации могли быть связаны лишь с модификациями некоторых основных механизмов.

III.B. ОТ СИМБИОСОМЫ К ОРГАНЕЛЛЕ

Симбиосома определена как ограниченный мембраной компартмент, содержащий один или более симбионтов и локализованный в цитоплазме эукариотической клетки (Roth et al., 1988). Сам термин “симбиосома” подразумевал аналогию с органеллой. Подразумевалось, что подобно тому, как митохондрия обеспечивает дыхание, а хлоропласт — фотосинтез, эндосимбиотические ризобии определяют способность хозяина к усвоению молекулярного азота. Насколько мы можем считать симбиосому промежуточной стадией эволюции настоящих органелл?

III.B.1. Симбиогенные органеллы

В настоящее время симбиогенное происхождение митохондрий и хлоропластов уже не вызывает серьезных сомнений (Sapp, 1994). Сходство митохондрий с эубактериями, а хлоропластов с цианобактериями создало основу для торжества теории симбиогенного происхождения эукариотической клетки (Gray, Doolittle, 1979). В соответствии с этой теорией, прокариотические микроорганизмы включились в состав предка эукариотической клетки путем эндоцитоза, и их наружная мембрана соответствует плазматической мембране клетки-хозяина (Taylor, 1974) — перисимбиотической мембране (ПСМ). Внутренняя же мембрана органеллы соответствует плазматической мембране исходного симбионта, как это характерно для симбиосом.

Последние сомнения в симбиогенном происхождении хлоропластов и митохондрий рассеялись после изучения их молекулярной филогении (Bonen, Doolittle, 1976; Gray, 1985; Giovannoni et al., 1988; Sankoff et al., 1992). Сравнение аминокислотных последовательностей консервативных белков, таких как цитохром *c*, последовательностей рибосомных РНК (5S, 16S, 28S) и некоторых транспортных РНК у свободноживущих микроорганизмов, хлоропластов и митохондрий, а также эукариотических клеток-хозяев показало, что хлоропласты наиболее сходны с цианобактериями, а митохондрии — с α -пурпурными бактериями, однако не проявляют сходства с хозяйскими клетками.

Важным подтверждением теории симбиогенеза явилось то, что цианобактерии являются эндосимбионтами многих современных растений (в том числе, печеночников, папоротников, голозерянных и покрытосемянных), а Rhizobiaceae, представляющие α -пурпурные бактерии, являются эндосимбионтами бобовых. В то же время, все эти симбиозы возникали на разных этапах эволюции. Бобово-ризобияльный симбиоз, по-видимому, возник на заре эволюции бобовых (60–70 млн. лет назад), а арбускулярная микориза — вместе с наземными растениями (400–450 млн. лет назад). В то же время, приобретение предками эукариот примитивных митохондрий, по-видимому, произошло до разделения растений и животных, и возможно, явилось одним из основных условий этого разделения. Приобретение эукариотами хлоропластов, по-видимому, произошло позднее — в процессе или даже после дивергенции растений и животных (Gray, 1985; Giovannoni et al., 1988).

III.B.2. Организация генов в симбиосомах и органеллах

Несмотря на общее сходство генетической организации эндосимбиотических органелл и прокариот, между ними выявляются и существенные различия. Хотя генетическая организация хлоропластов сильно варьирует, для большинства из них характерно наличие генов, кодирующих синтез РНК, а также некоторые ферментов (Palmer, 1985). В то же время, ряд генов, необходимых для функционирования хлоропластов и гомологичных генам прокариот, обнаруживаются в ядре, куда, по-видимому, они были перенесены в процессе коэволюции двух генетических систем. Такая же картина, хотя и в более сложной форме, выявляется и при изучении митохондрий, генетическая организация которых варьирует очень сильно. Например, митохондрии высших растений содержат сложный набор кольцевых и линейных молекул ДНК (Leaves, Gray, 1982), что отличает их от митохондрий человека и животных (Attardi, 1985). Сейчас известно около 80 митохондриальных генов, из которых одни находятся в самих органеллах, а другие выявлены в ядре или в хлоропластах, где функционируют, используя иные системы регуляции транскрипции, трансляции и посттрансляционной модификации (Mullet, 1988). Более того, изучение митохондриального генома позволило выявить ряд отклонений от универсального генетического кода и особые механизмы редактирования РНК.

Изучение митохондрий даст крайний пример эволюции симбиоза, когда эндосимбионт как таковой уже более не нужен хозяину, а необходимы лишь некоторые функционально значимые гены. Отбор действует именно на функции генов, а не на их организацию, и в результате этого формируются новые регуляторные системы, координирующие работу генов симбионта и хозяина. Во многих случаях наиболее эффективные системы формируются при переносе генов митохондрий в ядро или в хлоропласты (Timmis, Scott, 1984; Schuler, Brennecke, 1987; Palmer, 1990; Breiman, Galun, 1990). Здесь отбор действует уже не на индивидуальные симбионты, а на систему в целом. Чрезвычайная изменчивость митохондрий может быть связана с различиями в генетической организации хозяйских клеток, разными условиями и механизмами их эволюции, а также может быть результатом накопления случайных различий.

Все эти данные позволяют сформулировать вопрос о том, может ли симбиосома, содержащая ризобии, рассматриваться как начальная стадия эволюции органелл. До сих пор не было получено доказательств переноса генов ризобий в растительные клетки, хотя такой перенос характерен для рода *Agrobacterium*, близкого к *Rhizobium*. В то же время, имеются доказательства возможности переноса в ризобии растительных генов. Об этом говорят рассмотренные выше данные о сходстве бактериальной GSII с GS растений, выявленное для *Rhizobium*, *Agrobacterium* и *Frankia* (раздел III.A.2.). Имеются данные о наличии характерных для эукариот последовательностей ДНК в плазмидах *Rhizobium* (Yeoman, 1996) и *Agrobacterium* (Margelli et al., 1994).

Если в бактериодах и происходит утрата некоторых фрагментов ДНК, то она ограничена нежизнеспособными клетками и не может иметь эволюционных последствий. В симбиосомах бактериоды развиваются из нормальных бактерий, которые проникают в корни из ризосферы. Сапрофитный рост является обязательной частью жизненного цикла ризобий, и для этого необходим интактный геном. Бактерии, утратившие важные гены, неминуемо погибнут, если не будут немедленно поглощены растительной клеткой. В то же время, эндоцитозу предшествует сложный инфекционный процесс, в ходе которого происходят многократные деления бактерий. Эволюция истинных органелл станет возможной лишь после того, как ризобии попадут в репродуктивные органы хозяев и включатся в их жизненный цикл.

Исходный симбиогенез хлоропластов и митохондрий происходил еще в то время, когда хозяева были одноклеточными, что облегчило включение эндосимбионта в жизненный цикл хозяина. Симбиоз с ризобиями симбиоз возник уже у высших растений и зависел от новых инфекций. Поэтому его следует рассматривать не как промежуточную стадию эволюции новых органелл, а как пример симбиогенной эволюции.

IV. Общие выводы и заключительные замечания

В своей статье мы попытались определить место бобово-ризобияльного симбиоза среди всего многообразия растительно-микробных взаимодействий. Эти взаимодействия включают поверхнос-

тные контакты (ризосферные бактерии, эпифиты), заселение микробами различных полостей (цианобактерии — папоротник *Azolla*), инфицирование поверхностных клеток и разные формы эндосимбиоза. В одних случаях наблюдают адаптации у отдельно взятых партнеров, в других случаях факторы эволюции действуют на симбиотическую систему в целом. Для бобово-ризобияльного симбиоза мы имеем дело с сочетанием высокоспециализированной эндосимбиотической системы и процессов, связанных с сапрофитным существованием микроорганизма и с инфицированием растений. По сравнению с другими азотфиксирующими симбиозами, ситуация необычна тем, что нитрогеназная активность, определяющая экологическую ценность взаимодействия, индуцируется лишь на его поздних стадиях. Поэтому эволюция взаимодействия должна иметь механизмы “обратной связи”, необходимые для становления более ранних стадий симбиоза.

Весьма сложным является вопрос о соотношении эволюции симбиотических организмов и их свободноживущих родичей. Специфические особенности ниш, в которых обитают эндофиты, популяционная структура этих организмов, которая формируется при отсутствии многих селективных факторов, действующих в популяциях свободноживущих микробов, приводят к ускорению эволюции, что показано для эндосимбиотических бактерий *Buchnera* (Morgan, 1996). Данные о переносе генов между симбионтом и хозяином, а также о передаче плазмид между разными типами симбионтов (*Rhizobium* и *Agrobacterium*) также очень важны для понимания механизмов эволюции симбиоза.

Успешная эволюция высокоорганизованных симбиотических систем, в которых происходят разнообразные взаимодействия, могла потребовать относительно небольших изменений систем регуляции генов за счет использования сигнальных факторов, регулирующих различные метаболические процессы. Со стороны бактерий это иллюстрируют LysR-подобные регуляторы, двухкомпонентные регуляторные системы, поверхностные полисахариды, а со стороны растений — различные рецепторы, лектины, системы синтеза гормонов и флавоноидов. Для обоих партнеров важную роль в формировании симбиотических адаптаций играли компоненты мембран (Assmann, 1995).

Сравнительное изучение мутуалистических и патогенных взаимодействий откроет возможность для выявления новых сигнальных и регуляторных систем, играющих важную роль в эволюции симбиоза. Анализ других растительных эндосимбиозов (актинориза, микориза) даст возможность для проведения сравнительных исследований, которые окажутся полезными для выяснения путей эволюции бобово-ризобияльного симбиоза. Перспективным представляется выяснение роли небольших цистеин-богатых белков (элизитины, гидрофобины) в мутуалистических и патогенных взаимодействиях растений с грибами (Templeton et al., 1994; Wessels, 1996).

Далеко не все специфические особенности растительно-микробных взаимодействий могут рассматриваться как эволюционные адаптации. В некоторых случаях они могли возникать в результате закрепления случайно возникших генетических изменений. Тот факт, что на молекулярном уровне в симбиотических системах выявлен ряд компонентов, выполняющих регуляторные функции у свободноживущих организмов, показывает, что симбиозы могут быть основаны на небольшом количестве эволюционных новаций. Таким образом, симбиозы формировались в значительной степени за счет “эволюционной шлифовки” (Jacob, 1982) ранее существовавших генетических систем.

V. Литература

- Adams T.H., Chelm B.K. (1988) J. Gen. Microbiol. V. 134, p. 611-618.
Alloway D., Vocsten B., O'Gara F. (1995) FEMS Microbiol. Lett. V. 128, p. 241-245.
Amar M., Patriarca E.J., Manco G., Bernard P. (1994) Mol. Microbiol. V. 11, p. 685-693.
Appleby C.A. (1974) In: The Biology of Nitrogen Fixation. Quispel A. (ed.) p. 521-554, North Holland/Amer. Elsevier, Amsterdam/NY.
Appleby C.A. (1984) Annu. Rev. Plant Physiol. V. 35, p. 443-478.
Appleby C.A., Tjepkema J.D., Trinick M.D. (1983) Science. V. 220, p. 951-953.
Ardourel M., Demont N., Debelle F., Maillot F., de Billy F., Prome J.C., Denarie J., Truchet G. (1994) The Plant Cell. V. 6, p. 1357-1374.
Assmann S.M. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 92, p. 1795-1796.
Attardi G. (1985) Int. Rev. Cytol. V. 93, p. 93-145.

- Baker D., Miller N.G. (1980) *Can. J. Bot.* V. 58, p. 1612-1620.
- Baker M.E. (1991) *Can. J. Microbiol.* V. 38, p. 541-547.
- Baker M.E. (1994) *Steroids.* V. 59, p. 248-258.
- Barbour M., Hattermann D.R., Stacey G. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 57, p. 2635-2639.
- Bashan Y., Levanony H. (1991) *Plant and Soil.* V. 137, p. 175-179.
- Bassarab S., Werner D. (1987) *J. Plant Physiol.* V. 130, p. 233-241.
- Bauer P., Ratet P., Crespi M.D., Schultze M., Kondorosi A. (1996) *The Plant J.* V. 10, p. 91-105.
- Becard G., Douds D.D., Pfeffer P.E. (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 58, p. 821-825.
- Bergersen F.J. (1974) In: *The Biology of Nitrogen Fixation*, Quispel A. (ed.), p. 473-498, North Holland/Amer. Elsevier, Amsterdam/NY.
- Bergersen F.J., Turner G.L. (1967) *Biochem. Biophys. Acta.* V. 141, p. 507-515.
- Bergman B., Rai A.N., Johansson C. (1993) *Symbiosis.* V. 14, p. 61-81.
- Berry A.M., Kleemann G. (1993) In: *Nitrogen Fixation with Non-Legumes*. Hegazi N.A. et al. (eds.), p. 191-199, Amer. Univ. Cairo Press, Cairo.
- Birkenhead K., Noonan B., Reville W.J., Boesten B., Manian S.S., O'Gara F. (1990) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 3, p. 167-173.
- Blumwald E.B., Fortin M.G., Phillips A.R., Poole R.J. (1985) *Plant Physiol.* V. 78, p. 665-672.
- Boller T. (1995) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* V. 46, p. 189-214.
- Bonen L., Doolittle W.F. (1976) *Nature.* V. 261, p. 669-673.
- Breiman A., Galun E. (1990) *Plant Sci.* V. 71, p. 3-19.
- Brown C.M., Dilworth M.J. (1979) *J. Gen. Microbiol.* V. 101, p. 51-56.
- Burggraaf A.J.P., Valstar J. (1984) *Plant and Soil.* V. 78, p. 29-43.
- Campbell R., Graves M.P. (1990) In: *The Rhizosphere*. Lynch J.M. (ed.), p. 11-35, Wiley, Chichester.
- Castle A.-J., Day A.W. (1984) *Phytopathology.* V. 74, p. 1194-1984.
- Cullimore J.V., Milfin B.J. (1983) *FEBS Lett.* V. 158, p. 107-112.
- Cullings K.W., Szaro T.M., Bruns T.D. (1996) *Nature.* V. 379, p. 63-66.
- Dakora F.D., Joseph C.M., Phillips D.A. (1993) *Plant Physiol.* V. 101, p. 819-824.
- Dakora F.D., Joseph C.M., Phillips D.A. (1993) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 6, p. 665-668.
- Dakora F.D., Phillips D.A. (1996) *Physiol. Mol. Plant Pathol.* V. 49, p. 1-20.
- Darrow R.A., Crist D., Evans W.R., Jones B.L., Keister D.L., Knotts R.R. (1981) In: *Curr. Persp. Nitrog. Fixat.* Gibson A.H., Newton W.E. (eds.), p. 182-185, Canberra, Austral. Acad. Sci.
- Darvill A.G., Albersheim P. (1984) *Annu. Rev. Plant Physiol.* V. 35, p. 243-275.
- Day D.A., Copeland L. (1991) *Plant Physiol. Biochem.* V. 29, p. 185-201.
- Day D.A., Udvardi M.K. (1992) *Symbiosis.* V. 14, p. 175-189.
- De Boer M.H., Djordjevic M.A. (1995) *Protoplasma.* V. 185, p. 58-71.
- De Bruijn F.J., Hilgert U., Stigter J., Schneider M., Meyer H., Klosse U., Pawlowski K. (1990) In: *Nitrog. Fixat. Achiev. Object. Gresshoff P.M. et al. (eds.), p. 33-44, Chapman & Hall, NY.*
- De Vries G.E., Oosterwijk E., Kijne J.W. (1983) *Plant Sci. Lett.* V. 32, p. 333-341.
- De Vries G.E., van Brussel A.A.N., Quispel A. (1982) *J. Bacteriol.* V. 149, p. 872-879.
- De Weger L.A., van der Bij, Dekkers L.C., Simons M., Wijffelman C.A., Lugtenberg B.J.J. (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* V. 17, p. 221-228.
- Denarie J., Cullimore J. (1993) *Cell.* V. 74, p. 951-954.
- Denarie J., Debelle F., Truchet G., Prome J.C. (1993) In: *New Horiz. Nitrog. Fixat.* Palacios R. et al. (eds.), p. 19-30, Kluwer Acad. Publ. Dordrecht.
- Dharmatilake A.J., Bauer W.D. (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 58, p. 1153-1158.
- Diaz C.L., Melchers L.S., Hooykaas P.J.J., Lugtenberg B.J.J., Kijne J.W. (1989) *Nature.* V. 338, p. 579-581.
- Diaz C.L., Spaink H.P., Wijffelman C.A., Kijne J.W. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 348-356.
- Djordjevic M.A., Gabriel D.W., Rolfe B.G. (1987) *Annu. Rev. Phytopath.* V. 25, p. 145-168.
- Dobereiner L., Day J.M. (1976) In: *Nitrogen Fixation by Free-Living Organisms*. Newton W.E., Nyman C.J. (eds.), p. 518-537, Washington State Univ. Press, Pullman.
- Douglas A.E. (1994) *Symbiotic Interactions*, Oxf. Sci. Publ. Oxford Univ. Press.
- Edmonds J., Noridge N.A., Benson D.R. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 84, p. 6126-6130.
- Ehrhardt D.W., Atkinson E.M., Long S.R. (1992) *Science.* V. 256, p. 998-1000.
- Elmerich C., de Zamaroczy M., Vieille C., Delorme F., Onyeocha Y.Y., Zimmer W. (1991) In: *Nitrogen Fixation*. Polsinelli M. et al. (eds.), p. 79-87, Kluwer Acad. Publ. Dordrecht.
- Finan T.M., McWhinnie E., Driscoll B., Watson R. (1991) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 4, p. 386-392.
- Fischer H.M., Hennecke H. (1987) *Mol. Gen. Genet.* V. 209, p. 621-626.
- Galun M., Bubrick P. (1984) In *Encyclopedia Plant Physiology* NS 17. Linsens H.F. (ed.), p. 362-406, Springer, Berlin.
- Geiger O., Thomas-Oates J.E., Glushka J., Spaink H.P., Lugtenberg B.J.J. (1994) *J. Biol. Chem.* V. 269, p. 11090-11097.
- Gianinazzi-Pearson V. (1996) *The Plant Cell.* V. 8, p. 1871-1883.
- Giovannoni S.J., Turner S., Olsen G.J., Barns S., Lane D.J., Pace N.R. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 3584-3592.
- Glazebrook J., Ichige A., Walker G.C. (1993) *Genes Develop.* V. 7, p. 1485-1497.
- Glenn A.R., Brewin N.J. (1981) *J. Gen. Microbiol.* V. 126, p. 237-241.

- Goethals K., van Montagu M., Holsters M. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 89, p. 1646-1650.
- Gray M.W. (1985) Trends in Genet. V. 5, p. 294-299.
- Gray M.W., Doolittle W.F. (1982) Microb. Rev. V. 46, p. 1-42.
- Gresshoff P.M., Rolfe B.G. (1978) Planta. V. 142, p. 329-332.
- Grob P., Hennecke H., Gottfert M. (1994) FEMS Microb. Lett. V. 120, p. 349-354.
- Grosskopf E., Ha D.T.C., Wingerder R., Rohrig H., Szecsi J., Kondorosi E., Schell J., Kondorosi A. (1993) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 6, p. 173-181.
- Gyorgypal Z., Kondorosi A. (1991) Mol. Gen. Genet. V. 226, p. 337-340.
- Hirel B., Bouet C., King B., Layzell D., Jacobs F., Verma D.P.S. (1987) EMBO J. V. 6, p. 1167-1171.
- Hurek T., Reinhold-Hurek B., van Montagu M., Kellenberger E. (1991) In: Nitrogen Fixation. Polsinelli M. et al. (eds.), p. 235-242, Kluwer Acad. Publ. Dordrecht.
- Huss-Danell K. (1990) In: The Biology of *Frankia* and Actinorhizal Plants. Schwintzer C., Tjepkema J.D. (eds.), p. 129-156, Acad. Press, San Diego.
- Jacob F. (1982) The possible and the actual, Pantheon Books, NY.
- Jimenez J., Casades J. (1989) J. Heredity. V. 80, p. 335-337.
- Kape R., Wex K., Pamiske M., Gorge E., Wetzel A., Werner D. (1993) J. Plant Physiol. V. 141, p. 54-60.
- Kijne J.W. (1975) Physiol. Plant Pathol. V. 5, p. 75-79.
- Kijne J.W. (1992) In Biol. Nitrog. Fixat. Stacey G. et al. (eds.), p. 349-399, Chapman & Hall, NY.
- Kijne J.W., Planque K. (1979) Physiol. Plant Pathol. V. 14, p. 339-345.
- Koes R., Quattrocchio F., Mol J.N.M. (1994) BioEssays. V. 16, p. 123-132.
- Kuc J. (1995) Annu. Rev. Phytopathol. V. 33, p. 275-297.
- Laane C., Krone W., Konings W., Haaker H., Veeger C. (1980) Eur. J. Biochem. V. 103, p. 39-46.
- Labes M., Finan T.M. (1993) J. Bacteriol. V. 175, p. 2674-2681.
- Labes M., Rastogi V., Watson R., Finan T.M. (1993) J. Bacteriol. V. 175, p. 2662-2673.
- Laguette G., Bardin M., Amarger N. (1993) Can. J. Microbiol. V. 39, p. 1142-1149.
- LaRue T.A., Peterson J.B., Tajima S. (1989) In: Adv. Nitrog. Fixat. Res. Veeger C., Newton W.E. (eds.), p. 437-443, Nijhoff/Junk, The Hague/Wageningen.
- Leaves C.J., Gray N.W. (1982) Annu. Rev. Plant Physiol. V. 33, p. 373-402.
- Lechevalier M.P., Lechevalier H.A. (1990) In: The Biology of *Frankia* and Actinorhizal Plants. Schwintzer C.R., Tjepkema J.D. (eds.), p. 35-60, Acad. Press, San Diego.
- Libbenga K.R., van Iren F., Bogers R.J., Schraag-Lamers M.F. (1973) Planta. V. 114, p. 29-39.
- Long S.R. (1989) Annu. Rev. Genet. V. 23, p. 483-506.
- Long S.R., Staskawicz B.J. (1993) Cell. V. 73, p. 921-935.
- Lynch J.M. (1990) The Rhizosphere, Wiley, Chichester.
- MacDermott T.R., Graham P.H., Brandwein D.H. (1987) Arch. Microbiol. V. 148, p. 100-106.
- MacKay I.A., Dilworth M.J., Glenn A.R. (1988) J. Gen. Microbiol. V. 134, p. 1433-1440.
- Maillet F., Debelle J., Denarie J. (1990) Mol. Microbiol. V. 4, p. 1975-1984.
- Margulis L. (1993) Symbiosis in cell evolution. Freeman, NY.
- Martin P.M., Hortwitz K.B., Ryan D.S., McGuire W.L. (1978) Endocrin. V. 103, p. 1860-1867.
- Mellor R.B. (1989) J. Exp. Bot. V. 40, p. 831-839.
- Mellor R.B., Collinge D.B. (1995) J. Exp. Bot. V. 46, p. 1-18.
- Merrick M.J. (1993) In: New Horizons in Nitrogen Fixation. Palacios R. et al. (eds.), p. 43-54, Kluwer Acad. Publ. Dordrecht.
- Mews L.K. (1980) Proc. Roy. Soc. B. V. 173, p. 397-413.
- Michiels K., Croes C., Vanderleyden J. (1991) J. Gen. Microbiol. V. 137, p. 2241-2246.
- Moran N.A. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 93, p. 2873-2878.
- Moreno V.S., Meza R., Guzman J., Carabez A., Espin G. (1991) Mol. Plant-Microbe. Int. V. 4, p. 619-622.
- Morrison N., Verma D.P.S. (1987) Plant Mol. Biol. V. 9, p. 185-196.
- Mullet J.E. (1988) Annu. Rev. Plant Physiol. V. 39, p. 475-502.
- Muscatine L., Pool R.R., Cemichari E. (1972) Marine Biol. V. 13, p. 298-308.
- Nichaus K., Baier R., Kapp D., Lagares A., Meyer-Gatterman P., Sieben S., Puhler A. (1994) In: Proc. First Eur. Nitrogen Fixation Conf. Kiss G.B., Endre G. (eds.), p. 205-209, Officina Press, Szeged, Hungary.
- O'Brian M.R. (1996) J. Bacteriol. V. 178, p. 2471-2478.
- O'Gara F., Shanmugam K.T. (1976) Biochem. Biophys. Acta. V. 437, p. 313-332.
- O'Hara G.W., Riley L.T., Glenn A.R., Dilworth M.J. (1985) J. Gen. Microbiol. V. 131, p. 757-764.
- Ochman H., Groisman E.A. (1995) Can. J. Microbiol. V. 41, p. 555-561.
- Olivieri I., Frank S.A. (1994) J. Heredity. V. 85, p. 46-47.
- Page K.M., Guerin M.L. (1995) J. Bacteriol. V. 177, p. 3979-3984.
- Pankhurst C.E., Schwinghamer E.A., Bergersen F.J. (1972) J. Gen. Microbiol. V. 70, p. 161-177.
- Parniske M., Schmidt P.E., Kosch K., Moller P. (1994) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 7, p. 631-638.
- Pawlowski K., Bisseling T. (1996) The Plant Cell. V. 8, p. 1894-1913.
- Peters N.K., Verma D.P.S. (1990) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 3, p. 4-8.
- Planque K., de Vries G.E., Kijne J.W. (1978) J. Gen. Microbiol. V. 106, p. 173-178.
- Quispel A. (1951) Ant. van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol. V. 17, p. 69-80.

- Quispel A. (1959) In: *Handbuch der Pflanzenphysiologie XI Heterotrophie*. Mothes K. (ed.), p. 577-604, Springer, Berlin.
- Quispel A. (1992) In *Molec. Sign. Plant-Microbe Commun.* Verma D.P.S. (ed.), p. 471-491, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Quispel A., Kijne J.W., van Brussel A.A.N., Pees E., Wijffelman C.A., Burggraaf A.J.P. (1984) In *Adv. Nitrog. Fixat. Res.* Veeger C., Newton W.E. (eds.), p. 381-388, Nijhoff/Junk/Pudoc, The Hague/Wageningen.
- Quispel A., Svendsen A.B., Schripsema J., Baas W.J., Erkelens C., Lugtenburg J. (1989) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 2, p. 107-112.
- Quispel A., van Brussel A.A.N., Hooymans J.J.M., Priem W.J.J., Staal H.J.M. (1984) In: *Nitrogen Fixation and CO₂ Metabolism*. Ludden P.J., Burris J.W. (eds.), p. 193-202, Elsevier, NY.
- Remy W., Taylor T.N., Hass H., Kerp H. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 91, p. 11841-11843.
- Ren Y.Y., West C.A. (1992) *Plant Physiol.* V. 99, p. 1169-1178.
- Richardson D.H.S., Hill D.J., Smith D.C. (1968) *New Phytol.* V. 67, p. 469-486.
- Riopel J.L., Timko M.P. (1992) In: *Molec. Sign. Plant-Microbe Interact.* Verma D.P.S. (ed.), p. 494-507, CRC Press, Boca Raton.
- Roest H.P., Goosen-de Roo L., Wijffelman C.A., de Maagd R.A., Lugtenberg B.J.J. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 8, p. 14-22.
- Rohrig H., Schmidt J., Walden R., Czaja L., Lubenow H., Wencke U., Schell J., John M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 93, p. 13389-13392.
- Rolfe B.G., Djordjevic M., Scott K.F., Hughes J.E., Badenoch-Jones J., Gresshoff P.M., Cen Y., Dudman W.F., Zurkowski W., Shine J. In: *Curr. Persp. Nitrog. Fixat.* Gibson A.H., Newton W.E. (eds.), p. 142-145 Austral. Acad. Sci. Canberra.
- Ronson C.W. (1988) In: *Nitrog. Fixat. Hundred Years After*. Bothe H. et al. (eds.), p. 547-551, G. Fischer, Stuttgart.
- Ronson C.W., Lyttleton P., Robertson J.G. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 78, p. 4248-4288.
- Roth L.E., Jeon K., Stacey G. (1989) In: *Molec. Genet. Plant-Microbe Interact.* Palacios R., Verma D.P.S. (eds.), p. 220-225. Am. Phytopat. Soc. Press, St. Paul.
- Rushing B.G., Yelton M.M., Long S.R. (1991) *Nucl. Acid Res.* V. 19, p. 921-927.
- Ryan C.A., Farmer E.E. (1991) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* V. 42, p. 651-674.
- Sapp J. (1994) *Evolution by Association*, Oxford Univ. Press, NY, Oxford.
- Schell M.A. (1993) *Annu. Rev. Microbiol.* V. 47, p. 597-626.
- Schlaman H.R.M., Horvath B., Vijgenboom E., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 4277-4287.
- Schlaman H.R.M., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1992) *J. Bacteriol.* V. 174, p. 5177-5182.
- Schuster W., Brennicke A. (1988) *Plant Sci.* V. 54, p. 1-10.
- Selim S., Delacour S., Schwencke J. (1996) *Arch. Microbiol.* V. 165, p. 252-257.
- Sengupta-Gopalan C., Pitas J.W. (1986) *Plant Mol. Biol.* V. 7, p. 189-200.
- Sequeira L., Gaard G., de Zoeten G.A. (1977) *Physiol. Plant Pathol.* V. 10, p. 43-50.
- Silvester W.B., Parsons R., Watt P.W. (1996) *New. Phytol.* V. 132, p. 617-625.
- Siquiera J.O., Safir G.R., Nair N.G. (1991) *New Phytol.* V. 118, p. 87-93.
- Skorupska A., Bialek U., Urbanik-Sypniewska T., van Lammeren A. (1995) *J. Plant Physiol.* V. 147, p. 93-100.
- Smit G., de Koster C.C., Schripsema J., Spaik H.P., van Brussel A.A.N., Kijne J.W. (1995) *Plant Mol. Biol.* V. 29, p. 869-873.
- Smith S.E., Smith F.A. (1990) *New Phytol.* V. 114, p. 1-38.
- Spaik H.P. (1995) *Annu. Rev. Phytopathol.* V. 33, p. 345-368.
- Spaik H.P. (1996) *Crit. Rev. Plant Sci.* V. 15, p. 559-582.
- Spaik H.P., Okker R.J.H., Wijffelman C.A., Tak T., Goosen-de Roo L., Pees E., van Brussel A.A.N. (1989) *J. Bacteriol.* V. 171, p. 4045-4053.
- Sprent J.I. (1994) *Plant and Soil.* V. 161, p. 1-10.
- Sprent J.I., de Faria M. (1987) In: *Nitrog. Fixat. Non-Legumes*. Skinner F.A. et al. (eds.), p. 3 11, Kluwer Acad. Publ. Dordrecht.
- Sprent J.I., Raven J.A. (1985) *Proc. Roy. Soc. Edinburgh.* V. 85 B, p. 215-237.
- Stowers M.D. (1985) *Annu. Rev. Microbiol.* V. 39, p. 89-108.
- Suharjo U.K.J., Tjepkema J.D. (1995) *Physiol. Plant.* V. 95, p. 247-252.
- Sullivan J.T., Eardly B.D., van Berkum P., Ronson C.W. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 62, p. 2818-2825.
- Taylor F.J.R. (1974) *Taxon.* V. 23, p. 229-258.
- Templeton M.D., Rikkerink E.H.A., Beever R.E. (1994) *Mol. Plant-Microbe Int.* V. 7, p. 320-325.
- Timmis J.N., Scott N.S. (1984) *Trends Biochem. Sci.* V. 9, p. 271-273.
- Tjepkema J.D., Asa D.J. (1987) *Plant and Soil.* V. 100, p. 225-236.
- Tobler F. (1925) *Biol. Flechten*, Borntragaer Berlin.
- Tsai Y.L., Benson D.R. (1989) *Arch. Microbiol.* V. 152, p. 382-386.
- Udvardi M.K., Ou Yang L.J., Young S., Day D.A. (1990) *Mol. Plant-Microbe Int.* V. 3, p. 334-340.
- Van Batenburg F.H.D., Jonker R., Kijne J.W. (1986) *Physiol. Plant.* V. 66, p. 476-480.
- Van Brussel A.A.N., Costerton J.W., Child J.J. (1979) *Can. J. Microbiol.* V. 25, p. 352-361.
- Van Brussel A.A.N., Planque K., Quispel A. (1977) *J. Gen. Microbiol.* V. 101, p. 51-56.
- Van Eijsden R.R., Diaz C.L., de Pater B.S., Kijne J.W. (1995) *Plant Mol. Biol.* V. 29, p. 431-439.

- Van Iren F., van der Knaap M., van den Heuvel J., Kijne J.W. (1983) In: Adv. Nitrog. Fixat. Res. Veeger C., Newton W.E. (eds.), p.433, Nijhoff, Junk, The Hague, Wageningen.
- VandenBosch K.A., Brewin N.J., Kannerberg E.L. (1989) J. Bacteriol. V. 171, p. 4537-4542.
- Vasse J., de Billy F., Camut S., Truchet G. (1990) J. Bacteriol. V. 172, p. 4295-4306.
- Vasse J., de Billy F., Truchet G. (1993) The Plant J. V. 4, p. 555-566.
- Werner D., Mellor R.B., Hahn M.G., Grisebach H. (1985) Z. Naturforsch. V. 40 c, p. 171-181.
- Wessels J.G.H. (1996) Trends Plant Sci. V. 1, p. 9-15.
- Williams V., Fletcher M. (1996) Appl. Environ. Microbiol. V. 62, p. 100-104.
- Wyss P., Mellor R.B., Wiemken A. (1990) Planta. V. 182, p. 22-26.
- Young J.P.W., Haukka K.E. (1996) New Phytol. V. 133, p. 87-94.
- Zimmerman W.J., Rosen B.H., Lumpkin T.A. (1989) New Phytol. V. 113, p. 497-503.

Симбиотическая азотфиксация у бобовых: сельскохозяйственные аспекты

Вэнс К.

I.	Важность азотфиксации, происходящей в клубеньках бобовых.....	541
II.	Симбиотическая азотфиксация.....	543
	II.A. Клубеньки и нитрогеназа.....	543
	II.B. Фотосинтез и азотфиксация.....	546
	II.C. Защита нитрогеназы от кислорода.....	548
	II.D. Выделение водорода.....	548
	II.E. Методы количественного изучения азотфиксации.....	549
	II.F. Количество азота, фиксируемого в клубеньках бобовых.....	550
III.	Селекция растений на повышение симбиотической активности.....	552
	III.A. Генетическая изменчивость.....	552
	III.B. Соя.....	552
	III.C. Фасоль.....	553
	III.D. Люцерна.....	553
IV.	Роль фиксированного азота в системах землепользования.....	554
V.	Новые приложения азотфиксирующих систем.....	557
	V.A. Важность.....	557
	V.B. Фиторемедиация.....	558
	V.C. Электрическая энергия и промышленные продукты.....	560
VI.	Выводы.....	561
VII.	Благодарности.....	561
VIII.	Литература.....	561

I. Важность азотфиксации, происходящей в клубеньках бобовых

Население Земли растет в соответствии с экспоненциальным законом (рис. 1), и к 2035 году, по-видимому, достигнет 10 миллиардов человек, то есть удвоится по сравнению с 1998 годом (Bockman et al., 1990). 90% людей будут жить в тропических и субтропических областях развивающихся стран Азии, Африки и Южной Америки (Waggoner, 1994). В этих странах 80% энергии и белка для питания людей поставляют растения, и эта тенденция будет сохраняться. В 1910 году люди потребляли около 10% углерода, фиксируемого в процессе фотосинтеза (Golley et al., 1992). В настоящее время они потребляют 40% этого углерода, а в 2030 году будут потреблять 80%. При нынешнем (1998 г.) размере населения Земли (около 5.7 миллиарда) на 1 человека в среднем приходится в день 70 г белка и 2400 килокалорий (Waggoner, 1994). Количество потребляемого белка варьирует в пределах 38-125 г, а килокалорий 1800-3500 в день, причем наименьшие значения характерны для развивающихся стран (Bongaarts, 1994). Ожидаемое удвоение населения Земли еще более усилит неравенство в условиях питания. Для того чтобы избежать этого, в ближайшие 40 лет мы должны добиться беспрецедентного увеличения урожайности растений. Это должно быть сделано в условиях значительного истощения многих первичных сельскохозяйствен-

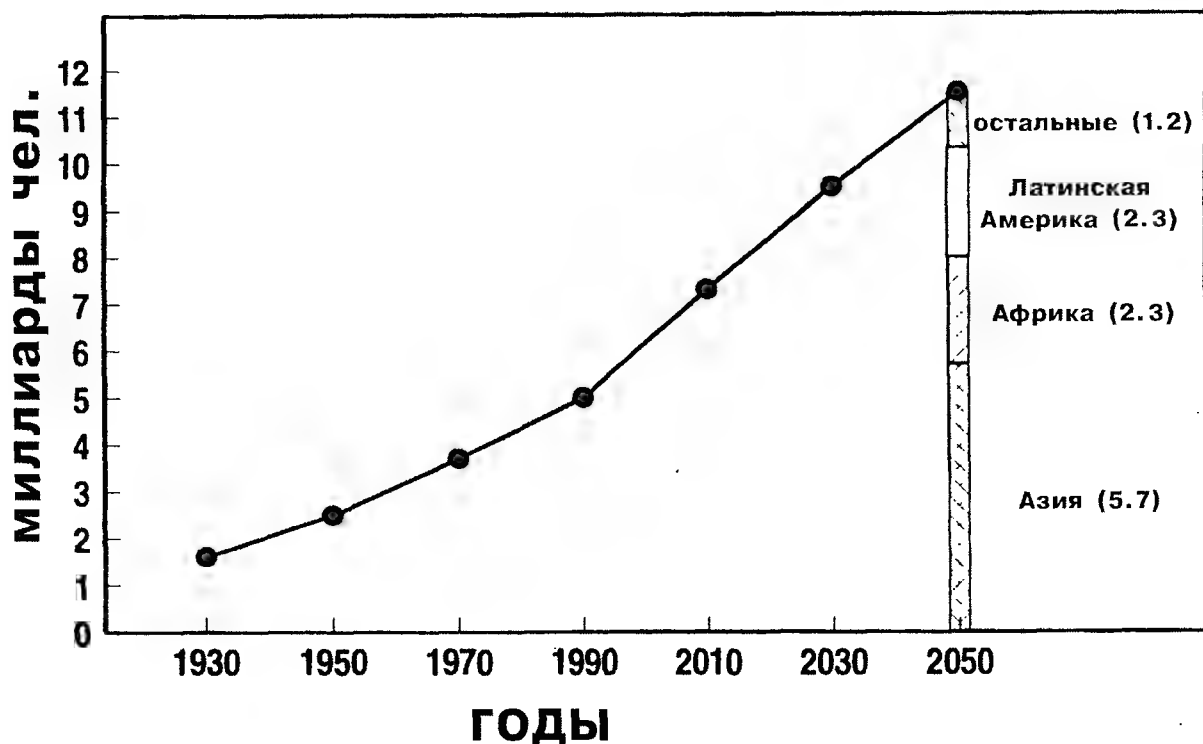


Рисунок 1. Предполагаемая динамика населения Земли на период до 2050 года (Bockman et al., 1990; Waggoner, 1994).

ных угодий и потребует вовлечения в сельскохозяйственную деятельность больших площадей, многие из которых не являются благоприятными.

Азот лимитирует рост большинства культурных растений. Фиксация и ассимиляция N_2 по своей значимости для растений сравнима только с фотосинтезом (Newbould, 1989). Производство высококачественной богатой белком пищи весьма существенно зависит от снабжения растений азотом. Резкий рост урожайности зерновых в 1950–1990 гг. был обусловлен 10-кратным увеличением применения азотных удобрений (рис. 2). Эта “зеленая революция” была связана с созданием сортов зерновых, которые могли использовать высокие дозы азотных удобрений: средний урожай зерна (7 т с 1 га) требует ассимиляции 200–300 кг азота на 1 га (Bockman et al., 1990; Waggoner, 1994). Следствием активного внесения в почву азотных удобрений в развитых странах стало выделение в атмосферу больших количеств оксидов азота (тепличных газов), истощение не воспроизводимых ресурсов, дисбаланс глобального азотного цикла и накопление нитратов в грунтовых водах (Kinzig, Socolow, 1994). Однако в развивающихся странах применение азотных удобрений было ограничено их дороговизной и проблемами транспортировки.

Устойчивое земледелие определяют как систему, обеспечивающую высокую эффективность использования и экономию природных ресурсов при сохранении окружающей среды, обеспечивающей поддержание и эволюцию биоразнообразия (Bohlool et al., 1992; Golley et al., 1992). Говоря проще, эта система позволяет удовлетворять нужды настоящего времени, не снижая этой возможности в будущем. Одним из основных направлений устойчивого земледелия является контроль за циркуляцией азотных соединений в экосистемах. Ограничение внесения азота в почву необходимо для сохранения ее плодородия. Использование экологически чистых источников “биологического азота” в большинстве случаев экологически оправдано (Bohlool et al., 1992; Vance, Graham, 1995). Например, использование растений, обеспечивающих накопление “биологи-

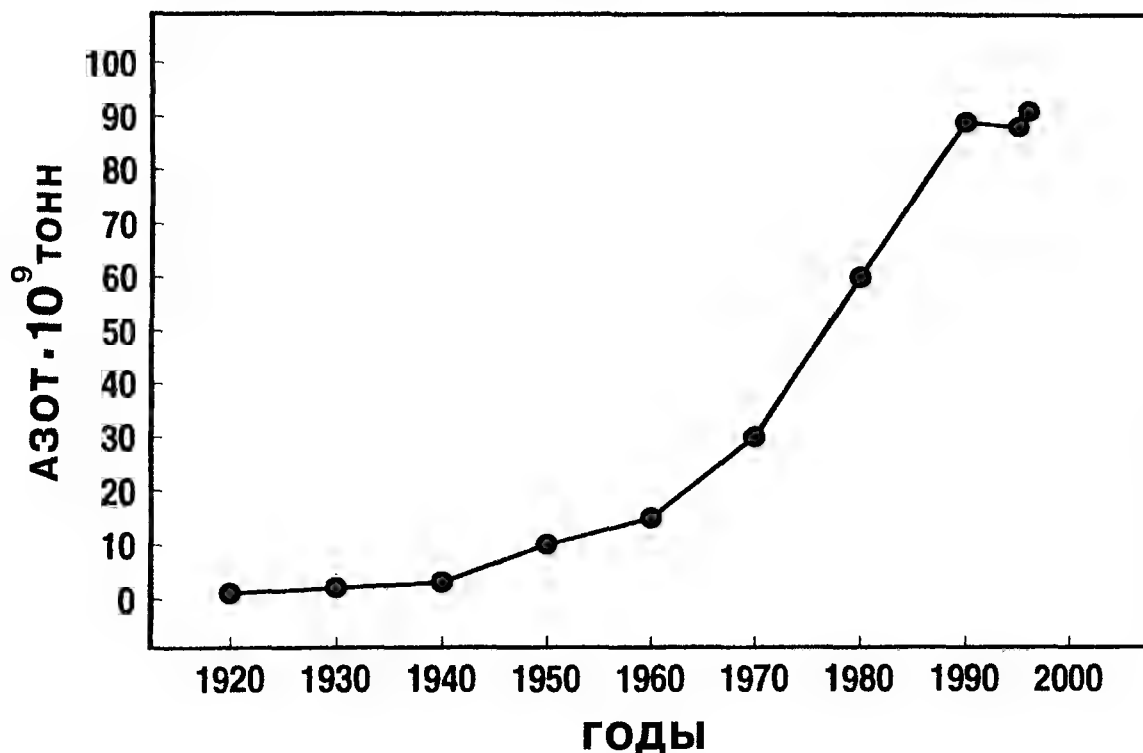


Рисунок 2. Использование азотных удобрений в 1920–1996 годах (Newbould, 1989; Waggoner, 1994).

ческого азота”, снижает потребность в азотных удобрениях и улучшает качество почвы. Биологически фиксированный азот связывается с органическим веществом почвы, что делает его менее доступным для физико-химической трансформации, обуславливающей вымывание и потерю в форме газов.

Системы биологической фиксации азота весьма разнообразны (табл. 1; Sprent, 1984), однако в большинстве агросистем большая его часть (около 80%) фиксируется при симбиозе бобовых с ризобиями — *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* (Vance, 1996). Бобовые обеспечивают 25–35% мирового производства белка. Они занимают площадь около 250 млн. га и обеспечивают фиксацию около 90 Tg азота в год (Kinzig, Socolow, 1994). Этот масштаб азотфиксации поразителен, так как общее количество нитрогеназы в мире оценивают в несколько килограммов (Delwiche, 1970). Для того, чтобы произвести эквивалентное количество безводного аммония посредством процесса Габера-Босха необходимо использовать 288 Tg топлива и тратить 30 миллиардов долларов США ежегодно. Поэтому очевидно, что одной из основных задач современного сельского хозяйства является повышение количества азота, фиксируемого бобовыми.

II. Симбиотическая азотфиксация

II.A. КЛУБЕНЬКИ И НИТРОГЕНАЗА

Экологической нишей для ризобий обычно являются корневые клубеньки (рис. 3), хотя бактерии рода *Azorhizobium* могут формировать их на стеблях некоторых бобовых (например, *Sesbania rostrata*). Корневые клубеньки содержат высокоорганизованные ткани, возникающие из кортекса

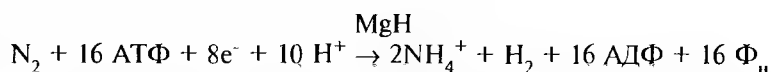
Таблица 1. Разнообразие азотфиксирующих ассоциаций (Sprent, 1984; Vance, 1996).

Растения	Род	Микроорганизм	Локализация симбионта	Фиксация N ₂ (кг/га за сезон)
Leguminosae (бобовые) ²	<i>Pisum, Glycine, Medicago</i> и др.	<i>Rhizobium, Bradyrhizobium, Azorhizobium</i>	Корневые (реже стеблевые) клубеньки	10-350
Ulmaceae	<i>Parasponia</i> ³	<i>Bradyrhizobium</i>	Корневые клубеньки	20-70
Betulaceae	<i>Alnus</i>	<i>Frankia</i> ⁴	Корневые клубеньки	15-300
Casuarinaceae	<i>Casuarina</i>	<i>Frankia</i> ⁴	Корневые клубеньки	10-50
Elaeagnaceae	<i>Eleagnus</i>	<i>Frankia</i> ⁴	Корневые клубеньки	НД ¹
Rosaceae	<i>Rubus</i>	<i>Frankia</i> ⁴	Корневые клубеньки	НД ¹
Папоротники	<i>Azolla</i>	<i>Anabaena</i>	Полости на дорзальной стороне листьев	40-120
Цикадовые	<i>Ceratozamia</i>	<i>Nostoc</i>	Модифицированные кораллоподобные корни	19-60
Лишайники	<i>Collema</i>	<i>Nostoc</i> ⁵	Пространства между гифами гриба	НД ¹

¹Нет данных; ²на способность к симбиозу с ризобиями изучено около 3000 видов (Allen, Allen, 1981); ³единственное небобовое, вступающее в симбиоз с ризобиями; ⁴актиномицет, образующий клубеньки на корнях растений из 8 семейств двудольных; ⁵*Nostoc* и другие цианобактерии обнаружены в 35 видах лишайников.

корня (Hirsch, 1992; Vance, 1996). Обычно клубеньки подразделяют на 2 группы: 1) недетерминированные – имеют стабильную апикальную меристему, удлинённо-цилиндрическую форму и транспортируют фиксированный азот в форме амидов (люцерна – *Medicago sativa*, горох – *Pisum sativum*, клевер – *Trifolium* spp.); 2) детерминированные – имеют сферическую форму, лишены стабильной меристемы, транспортируют азот в форме уреидов (соя – *Glycine max*, фасоль – *Phaseolus vulgaris*). Обычно многолетние бобовые имеют недетерминированные клубеньки, а однолетние бобовые – детерминированные клубеньки. Однако, из этого правила много исключений. Например, многолетний лядвенец (*Lotus*) имеет сферические детерминированные клубеньки, хотя в них транспортной формой азота являются амиды (Maxwell et al., 1984). *Pisum, Lens* и *Vicia*, являющиеся, как правило, однолетниками, формируют недетерминированные клубеньки, в которых также синтезируются амиды (Rosendahl et al., 1990). До сих пор не описано недетерминированных клубеньков, транспортирующих азот в форме уреидов.

Восстановление молекулярного азота в аммоний катализируется нитрогеназным ферментным комплексом, который синтезируют ризобии. На восстановление каждой молекулы N₂ расходуется 10 электронов, из которых 8 идут на образование NH₄⁺, а 2 – на выделение H₂ (Newton, 1993). Последний продукт считается побочным, так как его образование на 25% снижает эффективность работы фермента (Phillips, 1980). Нитрогеназа может восстанавливать и другие соединения с тройной связью, включая ацетилен (Hardy et al., 1968). Из уравнения нитрогеназной реакции следует, что для восстановления 1 г молекулярного азота необходимо израсходовать около 6 г глюкозы. На поддержание симбиотической азотфиксации растение должно расходовать 10-20% продуктов фотосинтеза (Phillips, 1980; Schubert, 1981).



При сравнении разных организмов было показано, что структура нитрогеназы весьма консервативна (Newton, 1993). Она состоит из 2 легко разделяемых компонентов: 1-го, содержащего молибден и железо, и 2-го, содержащего только железо (Dean, Jacobsen, 1992; Merrick, 1992). Компонент 2 является гомодимером (γ_2), состоящим из 2 субъединиц с молекулярной массой 30-

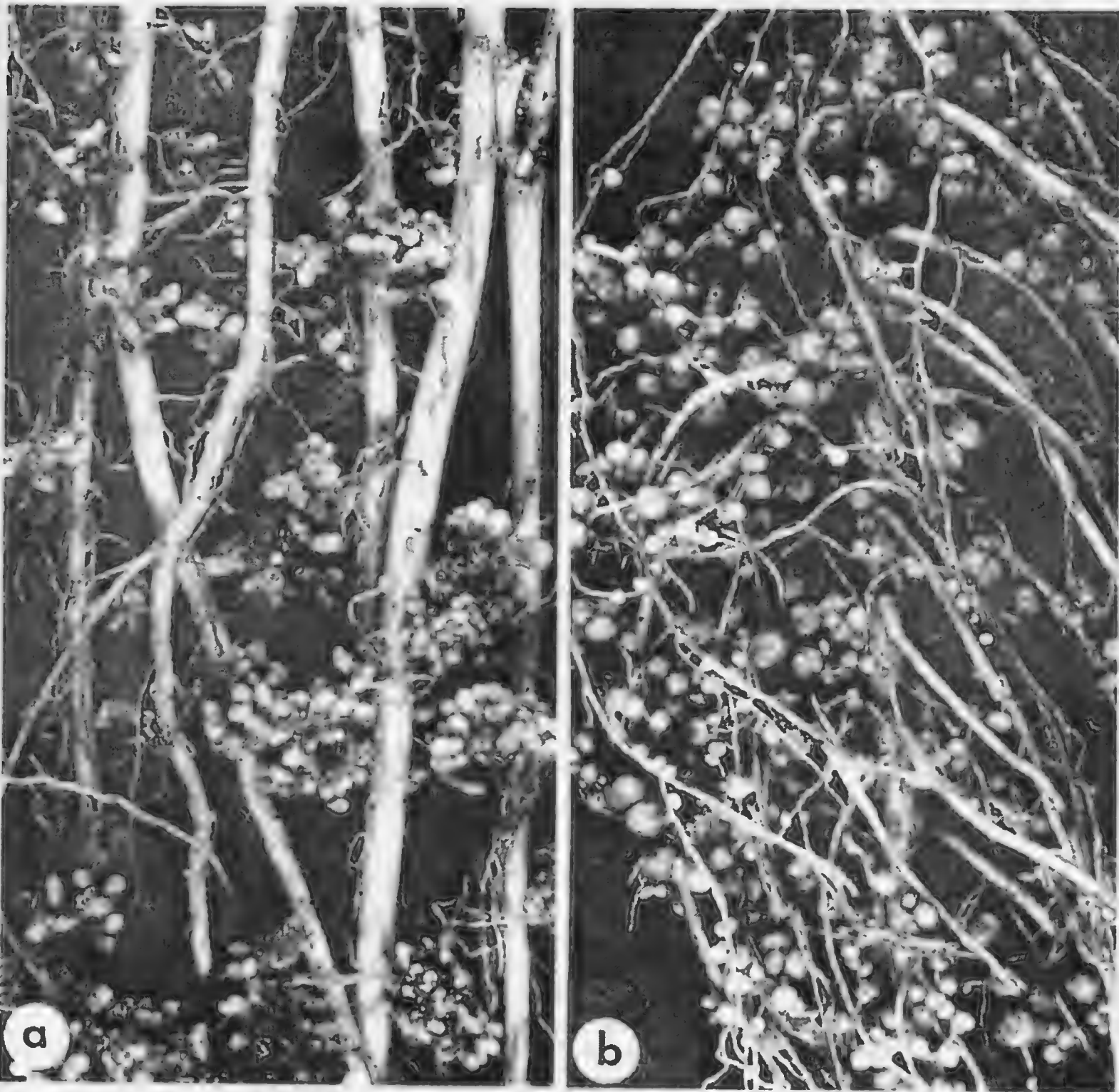


Рисунок 3. Клубеньки на корнях люцерны, *Medicago sativa* L. (a) и лядвенца, *Lotus corniculatus* L. (b).

32 кДа. Он содержит 4 г-атома железа и серы на 1 М. Атомы Fe и S образуют кластер $[4\text{Fe}-4\text{S}]$, который связывает 2 субъединицы. Этот компонент содержит 2 сайта для связывания Mg-АТФ, в результате которого происходит восстановление кластера $[4\text{Fe}-4\text{S}]$, после чего он становится донором электронов для компонента 1.

Компонент 1 является тетрамером ($\alpha_2\beta_2$) с молекулярной массой около 220 кДа. Молекулярная масса субъединиц составляет: 56 кДа для α и 60 кДа для β . Данный компонент содержит 2 атома молибдена и по 24-32 атома железа и серы. В его составе имеется 2-4 кластера $[4\text{Fe}-4\text{S}]$, а также 2 кластера $[\text{MoFe}^6\text{S}^8]$, которые образуют MoFe кофактор. Роль компонента 1 состоит в передаче электронов на N_2 и H^+ .

II.B. ФОТОСИНТЕЗ И АЗОТФИКСАЦИЯ

Продукты фотосинтеза, образующиеся в листьях, являются основным источником энергии для роста и поддержания клубеньков, дыхания бактериоидов и азотфиксации, а также источником углеродных скелетов для ассимиляции фиксированного азота (Phillips, 1980; Vance, Heichel, 1991; Hunt, Layzell, 1993). Тесная связь азотфиксации и фотосинтеза видна из сходства динамики роста растений, ассимиляции углерода и фиксации азота (рис. 4, 5). В условиях, способствующих повышению активности фотосинтеза, например, при повышенной концентрации CO_2 (табл. 2), обычно наблюдают возрастание массы клубеньков, а также интенсивности фиксации и ассимиляции азота (Zanetti et al., 1996).

Однако в кратковременных опытах эту связь проследить достаточно трудно. Окольцовывание стебля, удаление листьев или помещение растений в темноту обычно ингибирует азотфиксацию (рис. 4; Vance, Heichel, 1991). Первоначально эти эффекты связывали с ограничением поступления в клубеньки фотосинтатов. Позднее оказалось, что эти воздействия в первую очередь нарушают диффузию кислорода в клубеньки (Denison et al., 1992; Hunt, Layzell, 1993; Hartwig, Nosberger, 1994). То, что текущее снабжение клубеньков фотосинтатами играет менее важную роль, следует из данных о низкой суточной вариабильности нитрогеназной активности корней с клубеньками при постоянной температуре и кратковременной (1.5–36 часов) стимуляции фотосинтеза добавлением CO_2 (Vance, Heichel, 1991). Низкая зависимость азотфиксации от текущего снабжения клубеньков фотосинтатами показана на зрелых растениях люцерны, у которых нитрогеназная активность поддерживалась на высоком уровне в течение 12.5 часов после удаления надземной части. Низкие температуры увеличивали это время, а высокие — уменьшали.

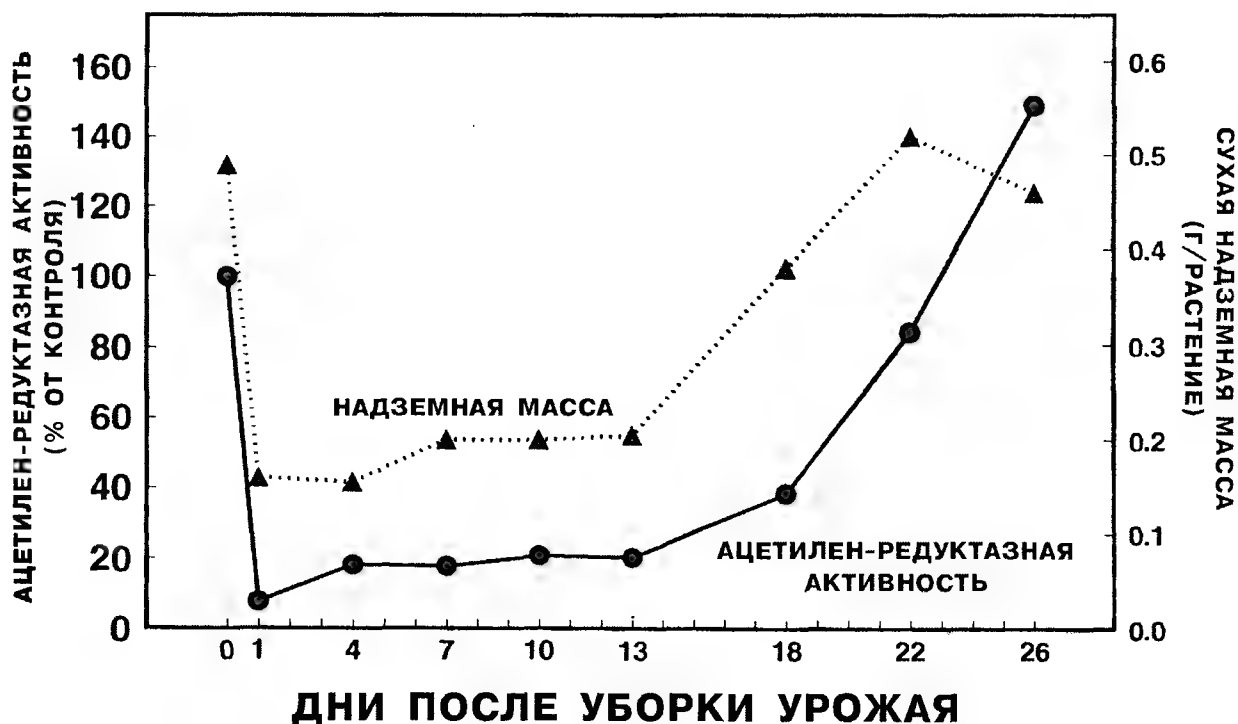


Рисунок 4. Продуктивность и азотфиксация (измеренная после укоса) у люцерны; 0 соответствует дате укоса (Vance et al., 1978).

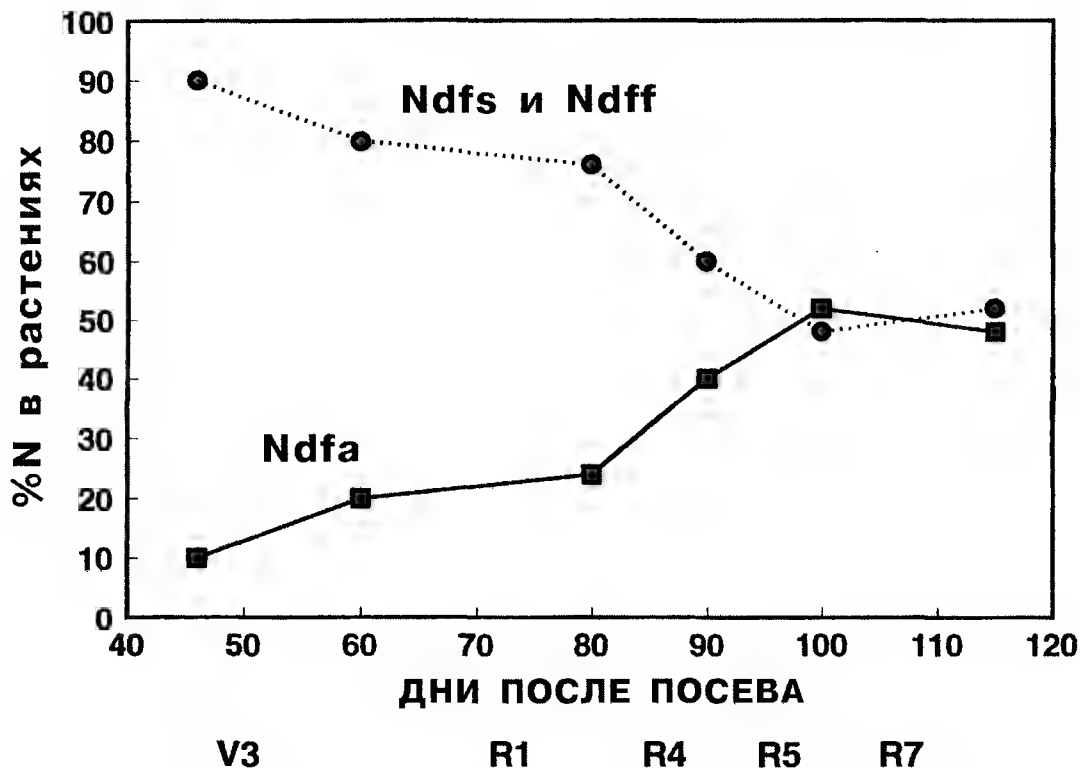


Рисунок 5. Динамика накопления азота у сои (Ndfa — азот, фиксированный из атмосферы, Ndfs — азот, ассимилированный из почвы, Ndff — азот из удобрений) (Zapata et al., 1987).

Вопрос о том, насколько снабжение энергией ограничивает азотфиксацию, является сложным. Опыты с использованием меток показали, что клубеньки не являются активными потребителями фотосинтатов (Vance, Heichel, 1991). Более того, накопление крахмала в инфицированных и неинфицированных клетках клубенька может происходить и при максимальной активности азотфиксации. Клубеньки обычно составляют менее 4% массы растений. В то же время, у фасоли и гороха получены мутанты, у которых масса клубеньков увеличена на 200% без видимого влияния на массу надземной части (Rosendahl et al., 1989; Hansen et al., 1993). Эти данные показывают, что хотя фотосинтаты и необходимы для активности клубеньков, их количество не является основным фактором, определяющим интенсивность азотфиксации.

Важным фактором, ограничивающим азотфиксацию, может быть лимитируемый кислородом углеродный обмен (Vance, Heichel, 1991; Hunt, Layzell, 1993; Hartwig, Nosberger, 1994). Гликолиз в O_2 -лимитированных клетках внутренней части клубенька направлен на накопление главным образом малата, а не пирувата. Поэтому в клубеньках создаются высокие концентрации малата и сукцината, которые являются непосредственными источниками энергии, потребляемыми бактериоидами при фиксации азота (Rosendahl et al., 1990; Day, Copeland, 1991; Vance, 1996). Они же являются и источниками углеродных скелетов для ассимиляции фиксированного азота. Остается неясным, насколько эффективна анаэробная адаптация такого пути по сравнению с гликолизом, направленным на получение пирувата. Однако мы знаем, что гликолиз, приводящий к образованию этанола, гораздо менее эффективен, чем гликолиз, приводящий к получению пирувата. Условия, приводящие к снижению уровня синтеза дикарбоновых кислот в клубеньках, обычно подавляют азотфиксацию.

Таблица 2. Действие CO₂ на нитрогеназную активность и продуктивность бобовых (Phillips et al., 1976; Masterson, Sherwood, 1978; Murphy, 1986).

Растение	Вариант	Масса растений (г)	N (%)	Клубеньки		Активность нитрогеназы	
				Масса (мг)	Число	Специфическая (нМ на мг клуб. в час)	Общая (мкМ на растение)
Люцерна	Опыт ¹	3.1*	2.52*	46*	124*	344	16*
	Контроль	2.0	2.95	28	77	356	10
Клевер	Опыт ¹	3.8*	2.47*	85*	344*	284	24*
	Контроль	2.3	3.01	66	270	252	16
Горох	Опыт ¹	3.6*	2.48*	27*	131*	226	37*
	Контроль	3.0	2.28	14	87	193	18

¹CO₂:1000 ppm; *достоверные различия между опытом и контролем.

II.C. ЗАЩИТА НИТРОГЕНАЗЫ ОТ КИСЛОРОДА

Нитрогеназный комплекс быстро и необратимо инактивируется кислородом: этот фермент может работать лишь при низких концентрациях O₂. В то же время, получение больших количеств АТФ, необходимых для окислительного фосфорилирования в бактериоидах, невозможно без кислорода. Этот парадокс решается за счет особых адаптивных свойств клубенька, из которых главным является контроль над диффузией кислорода (Vance, Heichel, 1991; Hunt, Layzell, 1993). В кортикальных клетках клубенька концентрация кислорода близка к атмосферной, тогда как во внутренней части она составляет 10–30 нМ (условия практически анаэробные). Между кортексом и внутренней частью находится компактный слой толщиной в 2–4 клетки, в котором практически отсутствуют межклетники, – диффузионный барьер (Тьеркема, Yocum, 1974; Sheehy, 1987; Hunt, Layzell, 1993). Его проницаемость для кислорода варьирует в зависимости от условий среды, что обеспечивает наилучшую защиту нитрогеназы. В то же время, при благоприятных условиях интенсивность диффузии снижается, что обеспечивает повышение нитрогеназной активности. Хотя контроль диффузионных свойств барьера мало изучен, он очевидно связан с расширением или сжатием клеток, как это происходит в устьицах. Эти процессы объясняют также изменения количества воды и белка в клетках.

Другим важным фактором решения кислородного парадокса является левоглобин (Lb) – кислород-связывающий белок, находящийся в инфицированных клетках. Он сходен с гемоглобином животных и придает клубенькам розовый цвет. Lb обеспечивает перенос кислорода через цитоплазму растительной клетки к бактериям в концентрации, обеспечивающей активное окислительное фосфорилирование без нарушения нитрогеназной активности (Appleby, 1992). Левоглобин может составлять до 35% общего растворимого белка в клетках клубенька и является наиболее активно синтезируемым при симбиозе белком (Egli et al., 1991). Lb и кодирующие его гены выявлены у небобового *Parasponia*, а также в актиноризных клубеньках (Jacobsen-Lyon et al., 1995). Кроме того, гены синтеза Lb-подобных белков обнаружены у растений, вообще не образующих клубеньки – ячменя и кукурузы (Taylor et al., 1994). По-видимому, Lb и его гомологи широко распространены у растений и участвуют в регуляции различных процессов, связанных с кислородным статусом клеток.

II.D. ВЫДЕЛЕНИЕ ВОДОРОДА

Нитрогеназа передает значительное количество электронов на протоны, что приводит к формированию H₂ (Evans et al., 1987). Этот процесс является энергозависимым и приводит к

очевидным потерям энергии в клубеньках. При восстановлении каждой молекулы N_2 на образование H_2 затрачивается 4 молекулы АТФ и 2 электрона (Arp, 1992). Некоторые штаммы ризобий имеют особую "поглотительную" гидрогеназу, которая окисляет водород с образованием воды, что в некоторых случаях сопряжено с формированием АТФ. Этот фермент открывает для *Rhizobium* дополнительные биохимические возможности, связанные с экономией энергии и защитой нитрогеназы от ингибирования кислородом и водородом. В то же время, для симбионтов сои подобные преимущества выявить не удалось. Кроме того, регуляция гидрогеназной системы достаточно сложна, так как показано, что ее активность может супрессироваться или активироваться некоторыми генотипами растений.

II.E. МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИЗУЧЕНИЯ АЗОТФИКСАЦИИ

В полевых условиях бобовые получают значительные количества азота из почвы в форме нитрата и аммония, а также за счет фиксации из атмосферы. Эффективность использования этих источников зависит от количества подвижных форм азота в почве, эффективности симбиоза, внешних условий и генетических особенностей растений (Hardarson, Danso, 1993). При использовании метода Кьельдаля невозможно разделить фиксированный из атмосферы и ассимилированный из почвы азот. Для определения интенсивности азотфиксации используют три метода: 1) ацетилен-редуктазный, 2) разностный, 3) разведение (обогащение) изотопом ^{15}N (Nutman, 1976; Heichel, 1987; Hardarson, Danso, 1993; Herridge, Danso, 1995). Для фасоли был предложен дополнительный метод изучения количества азота в соке ксилемы (Herridge, Danso, 1995).

Метод ацетиленовой редукции (ARA) основан на способности нитрогеназы восстанавливать различные соединения, содержащие тройную связь, в том числе ацетилен до этилена (Hardy et al., 1968). Обычно корни с клубеньками инкубируют в атмосфере C_2H_2 , после чего количество образовавшегося C_2H_4 определяют путем газовой хроматографии. Эта методика чрезвычайно чувствительна, проста, не требует больших затрат времени и средств.

В то же время, метод ARA имеет ряд существенных ограничений (Sheehy, 1987; Hunt, Layzell, 1993). Она дает очень вариабильные данные, что делает возможным выявление только очень больших различий между разными вариантами опыта. Теоретически ожидаемое стехиометрическое соотношение реакции (3 М ацетилена на 1 М азота) в биологических системах точно не соблюдается и зависит от штамма ризобий, сорта и физиологических особенностей растений (Vessey, 1994). ARA измеряется в короткий промежуток времени и может использоваться 1-2 раза в неделю в течение вегетационного периода и поэтому не дает возможности судить об общем накоплении азота за вегетацию. И наконец, инкубирование в атмосфере ацетилена влияет на физиологические процессы в клубеньках, в частности, на диффузию кислорода (Sheehy, 1987; Hunt, Layzell, 1993; Minchin et al., 1994). В то же время, точное соблюдение методики может обеспечить получение ценных данных. Например, изучение интактных растений в проточных системах при кратковременной экспозиции в ацетилене позволяет проводить анализ без ингибирования нитрогеназы (Minchin et al., 1994; Vessey, 1994). Кроме того, метод ARA очень удобен в том случае, если перед исследователем стоит задача простого выявления нитрогеназной активности.

Разностный метод основан на определении различий в количестве азота между фиксирующими и не фиксирующими азот растениями (Heichel, 1987; Hardarson, Danso, 1993; Herridge, Danso, 1995). Для этого количество азота в растительной биомассе определяют по Кьельдалю. Метод достаточно точен, прост, не требует использования дорогостоящего оборудования и дает интегральную величину азотфиксирующей активности и роста растений за вегетационный сезон.

Трудности в использовании разностного метода связаны с выбором контроля. Для некоторых бобовых (люцерна, соя, нут, клевер, горох, вика) получены не способные к симбиозу формы, тогда как для большинства бобовых необходимо использовать растения, которые либо не были инокулированы, либо инокулированы не фиксирующими азот штаммами ризобий (Vance, 1996). Такие контроли часто бывают недостаточно адекватными, так как в почвах присутствуют гетерогенные популяции, состоящие из эффективных и неэффективных штаммов ризобий. Альтернатив-

Таблица 3. Азотфиксирующая активность и ее экономический эффект у различных бобовых

Виды	Среднее количество фиксируемого N ₂ (кг на га в сезон) ¹	Средний % фиксированного азота в растениях	Эквивалентная стоимость азотных удобрений, в долларах США ²
Кормовые культуры			
<i>Trifolium pratense</i>	170	59	119.0
<i>Lotus corniculatus</i>	92	55	64.4
<i>Medicago sativa</i>	180	70	126.0
<i>Vicia sativa</i>	130	70	91.0
<i>Trifolium repens</i>	172	75	120.4
<i>Desmodium</i> sp.	200	85	140.0
Зерновые культуры			
<i>Pisum sativum</i>	72	35	50.4
<i>Glycine max</i>	120	53	84.0
<i>Arachis hypogaea</i>	114	57	79.8
<i>Phaseolus vulgaris</i>	65	40	45.5
<i>Vigna angularis</i>	80	70	56.0
<i>Vicia faba</i>	151	80	105.7
<i>Lupinus angustifolius</i>	170	65	119.0
<i>Lens culinaris</i>	100	63	70.0

¹Использованы данные: Nuijman, 1976; Heichel, 1987; Peoples, Craswell, 1992; Peoples et al., 1995a, 1995b. ²Из расчета 0.7 доллара на кг.

ным подходом может быть использование небобового (например, злакового) растения, которое по динамике роста сходно с изучаемым бобовым. Однако, физиологические различия между бобовыми и злаковыми растениями (в первую очередь, в механизмах ассимиляции азота) затрудняют интерпретацию данных, полученные при использовании таких контролей.

Метод разведения стабильного нерадиоактивного изотопа азота ¹⁵N основан на внесении в почву нитрата или аммония, содержащего этот изотоп, после чего в растениях определяют соотношение ¹⁵N к ¹⁴N (учитывая, что ¹⁴N составляет 99.65% азота в атмосфере) (Heichel, 1987; Hardarson, Danso, 1993; Herridge, Danso, 1995). При активной фиксации азота растение будет обогащаться ¹⁴N, который "разбавляет" ¹⁵N, поступающий из почвы (чем активнее азотфиксация, тем сильнее разбавление ¹⁴N). Этот метод дает возможность прямого и точного определения количества фиксированного азота за вегетационный период. Он эффективен для определения вклада бобовых в азотный баланс травосмеси или культуры, выращиваемой после бобового в севообороте (Peoples, Craswell, 1992; Herridge, Danso, 1995).

Наиболее важными факторами, ограничивающими использование данного метода, являются высокая стоимость стабильных изотопов и оборудования, необходимого для измерения количества ¹⁵N. Кроме того, при использовании данного метода необходим не фиксирующий азот контроль, и это создает те же проблемы, что и в случае разностного метода.

II.F. КОЛИЧЕСТВО АЗОТА, ФИКСИРУЕМОГО В КЛУБЕНЬКАХ БОБОВЫХ

Количество симбиотически фиксируемого азота и его доля в азотном балансе растений зависит от многих генетических и средовых факторов, в том числе от вида растений (Ladha, Peoples,

Таблица 4. Азотфиксирующая активность и ее экономический эффект у деревянистых растений

Растения	Среднее количество фиксируемого N ₂ (кг на га в сезон) ¹	Средняя доля (%) фиксированного азота в растениях ¹	Эквивалентная стоимость азотных удобрений, в долларах США ²
<i>Casuarina</i>	180	47	126.0
<i>Alnus</i>	188	55	131.6
<i>Gliricidia</i>	170	53	119.0
<i>Acaçia</i>	30	25	21.0
<i>Leucaena</i>	300	60	210.0
<i>Sesbania</i>	160	63	112.0

¹Использованы данные: Danso et al., 1992; Peoples, Craswell, 1992; Peoples et al., 1995a; Sanginga et al., 1995. ²Из расчета 0.7 доллара на кг.

1995). Анализ средних значений этих величин показал (табл. 3, 4), что в целом многолетние кормовые бобовые культуры обеспечивают более интенсивную фиксацию азота, чем однолетние зерновые культуры. Весьма ограниченные данные о деревянистых бобовых показывают, что и они превосходят по интенсивности фиксации азота зернобобовые культуры. Эти различия могут быть связаны с тем, что многолетние кормовые бобовые могут давать несколько укосов за сезон, а деревянистые растения имеют большую биомассу. Другой причиной может быть то, что большинство кормовых и деревянистых бобовых образует недетерминированные клубеньки, которые могут фиксировать азот в течение продолжительного времени.

Типичные данные, полученные при изучении отрастания надземной массы после укоса люцерны, приведены на рисунке 4. Оказалось, что интенсивность азотфиксации резко снижается сразу после укоса, в течение 10-14 дней остается на низком уровне, после чего начинает быстро расти. Сходные данные получены при изучении лядвенца и клевера (Denison et al., 1992; Hartwig, Nosberger, 1994). В зависимости от растения и места проведения опыта этот цикл может повторяться 2-8 раз в год в течение всего времени выращивания культуры, что приводит к фиксации большого количества азота. Недетерминированные клубеньки, образованные в одном из циклов отрастания, могут функционировать в течение нескольких последующих циклов (Vance et al., 1979).

Динамика азотфиксации в течение вегетации была изучена также у сои (рис. 5) и фасоли адуки (табл. 5). У этих растений азотфиксация наиболее интенсивна во время цветения и созревания плодов (Hardarson, 1993). У сои в течение первых 20 дней после прорастания практически вся азотфиксация осуществляется в клубеньках, находящихся в области коронки, тогда как в последующие 76 дней доля фиксированного в них азота снижается до 20% (McDermott, Graham, 1989). У сои и фасоли на поздних стадиях развития наибольшее количество азота фиксируют клубеньки, расположенные на боковых корнях.

Поскольку азот, фиксируемый в клубеньках бобовых, гораздо более дешев, чем азотные удобрения, большой интерес представляет определение количества азотных удобрений, которое позволяет сэкономить симбиотическая азотфиксация (табл. 3, 4). Ее экономический эффект составляет, в зависимости от вида растений, 45-210 долларов на 1 га. Учитывая, что кукуруза, выращиваемая в США на площади 32 млн. га, может использовать 25 кг азота, фиксированного бобовым предшественником на 1 га, несложно подсчитать, что получаемый при этом экономический эффект составляет 560 млн. долларов в год (Peterson, Russelle, 1991). В расчете на типичную ферму, имеющую посевную площадь 150 га, экономия составит 2600 долларов в год (эта величина отражает удвоение стоимости азотных удобрений, произошедшее за последние 10 лет).

Таблица 5. Интенсивность фиксации азота у фасоли адзуки (*Vigna angularis*) в полевых условиях (данные автора)

Дата сбора урожая	Сухая масса (г/растение)	Общий азот (мг/растение)	Фиксированный азот	
			мг/растение	%
7-2-80	0.96	29.50	11.47	38
8-4-80	4.06	96.14	58.08	60
9-22-80	19.63	438.40	328.78	75

III. Селекция растений на повышение симбиотической активности

III.A. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Большинство изученных видов бобовых проявляет высокую изменчивость по признакам, связанным с симбиотической азотфиксацией (САФ). Они включают число и массу клубеньков, накопление азота, % азота, полученного из атмосферы, АРА, хозяйскую специфичность и активность ферментов, связанных с ассимиляцией фиксированного азота (Herridge et al., 1994). Был выявлен ряд менделирующих генов, ответственных за число клубеньков, сорто-штаммовую совместимость и чувствительность САФ к нитратам (Caetano-Anolles, Gresshoff, 1991). Использование этого генетического потенциала позволяет улучшать САФ у основных бобовых культур (Buttery et al., 1992; Herridge et al., 1994), то есть повышать урожайность в условиях лимитации по азоту или передавать значительные количества фиксированного азота совместно выращиваемым небобовым культурам. Предполагается, что за счет селекции растений интенсивность САФ может быть повышена на 300%, что является хорошим стимулом для исследований в этом направлении.

Селекция на повышение активности САФ может проводиться либо по косвенным признакам, например по массе растений и концентрации в них азота при лимитации по азоту, а также и по признакам, непосредственно связанным с САФ, — массе клубеньков, АРА, содержанию уреидов в ксилеме или по обогащению ^{15}N (Heichel et al., 1989; Bliss, 1993; Herridge et al., 1994). Соотношение этих подходов мы проиллюстрируем на примере сои, фасоли и люцерны.

III.B. СОЯ

Хотя САФ не включена в число признаков сои, по которым проводится ее селекция в США, повышение САФ было достигнуто при селекции на повышение урожая и содержания белка. Для ряда недавно отселектированных сортов сои характерно повышенное накопление азота по сравнению со стародавними сортами (Cregan, Yaklick, 1986). Например, полевые опыты с сортами Lincoln, Shelby, Williams, которые получены из линии Lincoln, показало, что селекция на повышение урожая привела к повышению концентрации и накопления общего, а также фиксированного азота (Coale et al., 1985).

Повышение активности САФ при селекции на продуктивность не ограничено соей (Duc et al., 1988). Например, при изучении 21 генотипа кормовых бобов, отобранных на высокую урожайность, показало, что у них усилена и САФ. В США селекция сои на повышение САФ проводится при выращивании на хорошо удобренной почве без контроля за инокуляцией ризобиями. Такая селекция привела к повышению специфичности сои по отношению к местным штаммам *Bradyrhizobium japonicum*, которые уступают производственным штаммам по азотфиксирующей активности (Buttery et al., 1992). Поэтому максимальная продуктивность сои в США не может быть достигнута в условиях чисто симбиотрофного азотного питания. Это видно из того, что американские сорта сои редко получают более 60% своего азота за счет САФ. В то же время, в Бразилии

селекция сои производится на фоне инокуляции высокоэффективными штаммами *B. japonicum* без внесения азотных удобрений (Dobereiner, 1987). Это привело к созданию сортов, способных формировать урожай без внесения азотных удобрений. Более того, повышение продуктивности сои в условиях почв церрадо было достигнуто за счет селекции антибиотико-устойчивых штаммов *B. elkanii* (Rumjanek et al., 1993), что связано с присутствием большого числа стрептомицетов, продуцирующих антибиотики.

III.C. ФАСОЛЬ

Низкая активность САФ была выявлена у многих сортов *Phaseolus vulgaris* уже достаточно давно (Graham, 1981). Для улучшения этой активности использовали методику получения инбредно-бэкркроссных линий, причем донором высокой активности САФ был примитивный сорт Puebla 152, а рекуррентными родителями — сорта, полученные с использованием современных методов селекции (Rosas, Bliss, 1986; Bliss, 1993). Селекция растений была основана на использовании ARA и ^{15}N -методологии на первых этапах селекции, а урожая семян и накоплении азота в условиях лимитации по азоту — на более поздних ее этапах (табл. 6).

III.D. ЛЮЦЕРНА

Для повышения эффективности САФ у люцерны было использовано несколько подходов. Один из них включал первичный отбор в условиях лимитации по азоту (что обеспечивало повышение активности САФ), а затем в условиях хорошего обеспечения связанным азотом (что улучшало активность поглощения из почвы и ассимиляции азота). В результате удалось повысить концентрацию азота в зеленой массе, а также ее урожайность в контролируемых условиях, однако в полевых опытах эти эффекты не были воспроизведены (Teuber et al., 1984; Teuber, Phillips, 1988). В случае сорта Моара 69 использование этого подхода позволило повысить общее накопление азота, а также количество фиксированного азота, но не урожайность растений (табл. 7; Phillips, Teuber, 1992). Повышение числа клубеньков, достигнутое в этих работах, было связано с усилением экскреции флавоноидов — индукторов *nod*-генов (Kapulnik et al., 1987).

Таблица 6. Повышение азотфиксации у линий фасоли, полученных с использованием инбридинга и возвратных скрещиваний (стадия R7 промежуточной спелости бобов)

Линия	% азота, полученного за счет фиксации	Количество фиксированного азота (мг/растение)	Азот в надземной массе (мг/растение)	Надземная масса (г/растение)
Puebla 152 (донор высокой азотфиксации)	50	589	1128	47
Salinac (рекуррентный родитель)	19	143	729	32
(17x48)-22	61	1028	1680	59
(17x65)-25	43	707	1511	63
24x17	46	573	1267	48
24x48	37	426	1146	43
24x65	36	504	1348	60
НСР (0.05)	13	336	487	16

Таблица 7. Селекция люцерны на повышенную урожайность и концентрацию азота для повышения интенсивности азотфиксации (представлены средние по 6 укосам в 1-й год выращивания; Phillips, Teuber, 1992)

Селекционная популяция	Урожай (кг/га)	Концентрация N (г/кг)	Общий азот (кг/га)	Фиксированный азот (кг/га)	
				Разностный метод	Разведение ^{15}N
Моара 69	3 300	32.4	107	37.3	58.1
Моара 69-33	3 300	34.7	115	45.3	68.2
CUF 101	3 400	32.1	109	39.3	63.3
HCP (0.05)	141	1.4	6	5.5	5.7

В университете штата Миннесота была разработана программа двунаправленной рекуррентной селекции люцерны по АРА, массе надземной части растений, корней и клубеньков (Barnes et al., 1984; рис. 6). Положительные результаты были получены в условиях теплицы, но они не воспроизводились в полевых условиях (Heichel et al., 1989). В процессе оценки полученного материала была изучена активность ферментов, участвующих в ассимиляции азота (Groat et al., 1984). Хорошую корреляцию с САФ проявили активности фосфоенолпируваткарбоксилазы (PEPC) и НАДФ-зависимой глутамат-синтазы (NADH-GOGAT). Поэтому среди линий, предварительно отобранных по нитрогеназной активности, была проведена селекция на различную активность PEPC и NADH-GOGAT (Jessen et al., 1987, 1988). Скрещивания линий, обладающих высокими активностями этих ферментов, с линией МпР1-11, позволили повысить накопление азота, массу растений и количество фиксированного азота (табл. 8). Остается неясным, связаны ли эти эффекты с активностью ферментов или с преодолением инбредной депрессии. Интересно, что растения, отобранные на снижение активностей PEPC и NADH-GOGAT, имеют сниженную продуктивность и азотонакопление (Jessen et al., 1988), что говорит о важности пороговых уровней этих ферментов для нормального роста люцерны.

Хотя количество линий бобовых, отобранных на повышение активности САФ, пока еще ограничено, это направление селекции представляется весьма перспективным. Сорты, которые будут создаваться в будущем, должны фиксировать такое же количество азота, как и наилучшие из известных генотипов. Эта работа должна проводиться с использованием методов прямого и косвенного отбора (в первую очередь, рекуррентной селекции) с использованием всей совокупности признаков, важных для этого процесса: адекватный баланс числа и массы клубеньков, продолжительность активности САФ, ассимиляция азота, устойчивость САФ к нитратам, координированный отбор активных штаммов ризобий. В будущем могут быть использованы и такие подходы как введение генов, контролирующих супернодуляцию, в агрономически продвинутые сорта, а также использование молекулярных маркеров, тесно сцепленных с генами высокой САФ-активности. Необходимо вовлекать в работу по улучшению САФ и древеснистые бобовые, имеющие важное экологическое значение (табл. 4).

IV. Роль фиксированного азота в системах землепользования

Растения, способные к симбиотрофному питанию азотом, играют важную роль в системах землепользования, так как окультурирование и селекция растений тесно связаны с использованием совместных посевов, севооборотов, пастбищ, зеленых удобрений, лесопосадок и покровных культур (Heichel, 1987; Peoples, Craswell, 1992; West, Mallarino, 1996). Совместное выращивание бобовых и небобовых культур (например, бобово-злаковых смесей) использовали для повышения

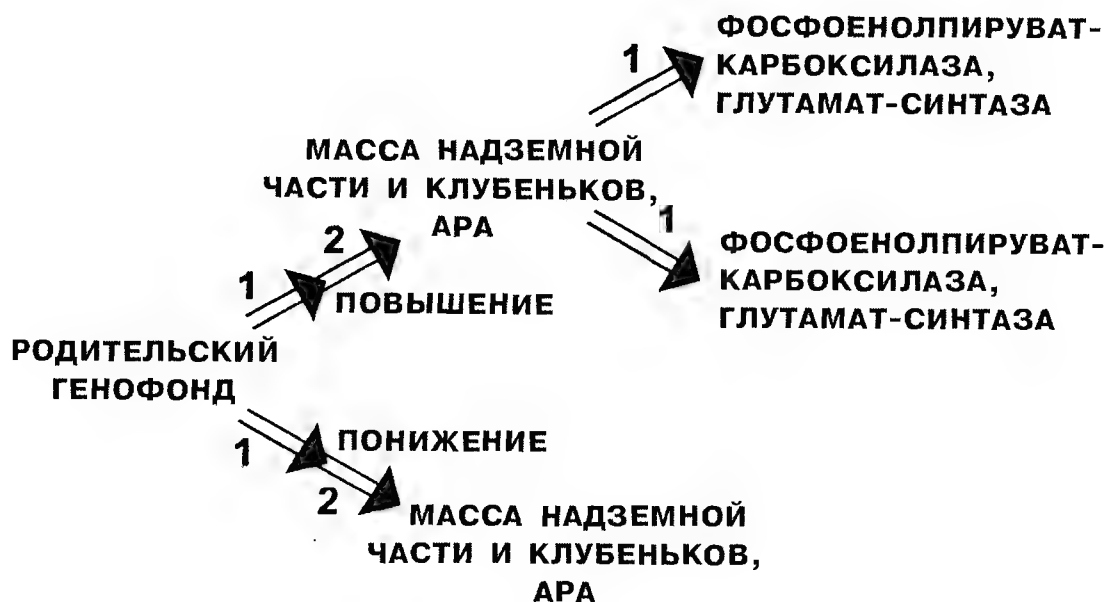


Рисунок 6. Схема двунаправленной рекуррентной селекции люцерны по признакам, связанным с азотфиксацией (Heichel et al., 1989).

белковой продуктивности задолго до освоения процесса Габера-Босха (Fujiata et al., 1992). В США и Европе использование бобовых как предшественников других культур наиболее активно использовалось в 40-х годах (Heichel, 1987). Однако затем возделывание бобовых сократилось в связи с дешевой азотных удобрений, созданием высокоурожайных сортов зерновых, а также с другими экономическими и социальными причинами (Heichel, 1987; Bohllool et al., 1992). Возвращение к широкому возделыванию бобовых в развитых странах возможно лишь после представления убедительных доказательств его экономической и экологической важности. Действие социальных и политических факторов также должно быть использовано для увеличения доли растений, способных к симбиотрофному питанию азотом, в агроэкосистемах.

В развивающихся странах Азии, Африки и Латинской Америки более 50% посевов проводится с участием растений, способных к САФ (Fujiata et al., 1992; табл. 9). В то же время, необходима разработка и внедрение новых, более эффективных систем использования САФ и в развивающихся странах.

Симбиотически фиксированный азот может стать доступным для небобовых растений за счет: 1) выделения в форме корневых эксудатов бобовых, 2) переноса в другие растения посредством арбускулярной микоризы (АМ), 3) освобождения азота из листового опада, 4) запахивания бобового к качеству зеленого удобрения, 5) разложения корней и клубеньков, 6) фекалий животных, поедающих бобовые (Peoples et al., 1995a). При этом количество и доступность фиксированного азота, передаваемого в агроэкосистему, зависит от генотипических и средовых факторов, а также от используемых агротехнических приемов. Точное измерение этого количества требует использования методологии ^{15}N (Heichel, 1987), а также специально полученных форм растений, неспособных к азотфиксации.

Считается, что небобовые растения, выращиваемые совместно с бобовыми, получают от них значительное количество фиксированного азота, однако это представление основано главным образом на косвенных данных (Heichel, 1987; Russelle, 1996; West, Mallarino, 1996). Использование методологии ^{15}N показало, что доля азота, получаемого небобовым растением от совместно

Таблица 8. Полевое испытание гибридов люцерны с высокой ферментативной активностью (ГВФ) и их родителей, имевших высокие активности PERC и NADH-GOGAT (данные автора)

Формы растений	Сухая масса (т/га)	Общий азот (кг/га)	Фиксированный азот (кг/га)	Ndfa (%)
1 Blazer	1.7	75	57	76
MNPL-11	1.7	72	55	77
ГВФ	2.0	85	67	79
2 Citation	1.5	63	47	74
MNPL-11	1.7	72	55	77
ГВФ	1.7	79	62	79
3 Saranac AR	1.9	86	69	80
MNPL-11	1.7	72	55	77
ГВФ	2.2	98	81	83
HCP (0.10)	0.26	13	13	-

выращиваемого бобового, колеблется (в зависимости от стадии развития растений, содержания азота в почве и близости растений) в пределах 0-70% (Heichel, 1987; Ledgard, Steele, 1992; West, Mallarino, 1996). Несмотря на значительное варьирование полученных значений (табл. 10), можно констатировать, что это количество обычно менее 40 кг азота на 1 га или менее 30% от общего азота небобового растения (Ledgard, Steele, 1992; Peoples et al., 1995b; West, Mallarino, 1996). Наиболее достоверные и значительные величины получены в тех случаях, когда бобовый и небобовый компоненты имели сходную динамику развития, содержание азота в почве было низким, а расстояние между растениями было оптимальным для их совместного развития (Brophy et al., 1987; Ledgard, Steele, 1992; Thomas, 1995; Russelle, 1996). В почвах с высоким содержанием азота количества передаваемого азота были незначительными в связи с ингибированием САФ и повышенной конкурентоспособностью небобового растения (Heichel, 1987; Fujiata et al., 1992; West, Mallarino, 1996). Опыты с люцерной и лядвенцем показали важную роль плотности посева в определении количества передаваемого азота (Brophy et al., 1987).

Были предприняты попытки определить относительную роль надземных и подземных частей растений в переносе фиксированного азота (Ta, Faris, 1987; Lory et al., 1992; Dubach, Russelle, 1994). Количество симбиотически фиксированного азота, поступающего в ризосферу люцерны, составляет 3 кг/га. Кроме того, за счет разложения корней и клубеньков люцерны небобовая культура может получать 13 и 2 кг/га азота, соответственно. По другим данным, количество азота, поступающего за счет распада клубеньков, не превышает 6 кг/га (Heichel, 1987). Поскольку общий перенос азота в этих опытах составил 30-40 кг/га, очевидно, что надземные органы люцерны играют в этом переносе не менее важную роль, чем подземные.

Таблица 9. Доля растений в смешанных посевах (Fujiata et al., 1992).
“+” — вид, используемый во всех системах выращивания

Виды	Регионы (% использования)			
	Нигерия	Уганда	Индия	Южная Америка
Кукуруза	76	84		50
Арахис	95	56		
Голубиный горох	99	76	90+	
Фасоль		81		80-90

Таблица 10. Перенос фиксированного азота из бобовых в небобовые культуры (Ledgard, Steele, 1992; Peoples et al., 1995a; West, Mallarino, 1996)

Бобово-злаковая смесь	Количество перенесенного азота (кг/га)	% азота, перенесенного от бобового	% фиксированного азота в злаке
Люцерна – канаресчник	9	13	68
Люцерна – ежа сборная	13	7	22
Люцерна – тимофеевка	10	5	24
Белый клевер – райграс	78	26	27
Белый клевер – овсяница	30	21	37
Лядвенец – канареечник	14	10	28
Красный клевер – райграс	30	23	39
Красный клевер – ежа сборная	38	19	58

Количество азота, получаемое небобовым растением от бобового, может быть определено путем сравнения роста после бобового предшественника и после внесения азотных удобрений. При этом наиболее эффективный перенос происходит в системе севооборота, когда листовая опад и корни бобовых, а иногда и целые растения, служат источником для обогащения почвы азотом. При этом небобовое реагирует на общее количество азота в почве, и эта реакция не зависит от соотношения азота, полученного путем САФ или из других источников (Heichel, 1987; Peoples et al., 1995a; Wani et al., 1995). Понимание этого факта необходимо для точного определения количества азотных удобрений, которое может быть заменено фиксированным азотом.

Оценки количества азота, получаемого небобовым растением от бобового предшественника, варьируют в пределах 0–110 кг/га (табл. 11). Эта вариабильность определяется разными причинами, в первую очередь, межвидовыми различиями растений. Кроме того, она связана с действием метеорологических условий, влажности, структуры и состава почвы, состава растительной биомассы (особенно соотношение C:N и количество фенольных веществ), количества бобового компонента, внесенного в почву. Показано, что эффективность бобового растения как удобрения на 40–70% связана с азотом (Heichel, 1987; Hesterman et al., 1987). Кроме того, она связана с оздоровлением почвы (подавление патогенов и сорняков), аллелопатическими эффектами и повышением водоудерживающей способности почвы (Peoples, Craswell, 1992).

Расширение исследований вклада САФ в продуктивность растений (Becker et al., 1995) призвано показать, какие виды растений должны вовлекаться в систему, какое количество азота при этом фиксируется и может замещать азотные удобрения. Необходимо определить и конкретный практический выход от вовлечения биологически фиксированного азота в схемы землепользования. Кроме того, следует развивать новые или улучшенные схемы использования азотфиксирующих культур, что сделает их привлекательными для внедрения в сельское хозяйство развивающихся стран.

V. Новые приложения азотфиксирующих систем

V.A. ВАЖНОСТЬ

Не вызывает сомнения, что использование бобовых в кормовых, пищевых и технических целях будет возрастать, что повысит их роль в формировании устойчивых сельскохозяйственных систем. Перспективы использования симбиотического потенциала бобовых многочисленны. Новые применения бобовых увеличат количество занимаемых ими площадей и разнообразие возделываемых культур.

Таблица 11. Количество азота, которое заменяет выращивание бобового предшественника в урожае зерна не фиксирующих азот культур (Heichel, 1987; Wani et al., 1995; Giller, Cadisch, 1995)

Бобовая культура-предшественник	Количество замещаемого азота (кг на 1 га)
Кормовые бобовые	
Люцерна	110
Донник	115
Красный клевер	88
Лядвенец	94
Зерновые бобовые	
Нут	70
Вигна	50
Голубиный горох	44
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	70
Горох	26

ваемых растений. Можно выделить три новых направления: 1) очистка почвы и воды (фиторемедиация), 2) получение электрической энергии, 3) производство промышленных, фармацевтических и естественных продуктов. Азотфиксирующие растения идеально подходят для этих целей, так как они могут использовать солнечную энергию для роста, азотфиксацию для снижения зависимости от удобрений, а многие из них могут служить реципиентами для новых хозяйственно-ценных генов.

V.V. ФИТОРЕМЕДИАЦИЯ

Разработка путей использования бобовых для фиторемедиации усилит их роль в развитии устойчивых агросистем. Возможность использования биологических объектов для очистки почвы и воды была осознана достаточно давно (Salt et al., 1995) и растения начали использовать для восстановления отвалов шахт, а также для очистки воды, поступающей на заливные луга. Позднее была показана способность растений к детоксикации различных веществ, что может быть связано либо со стимуляцией метаболизма ризосферных микроорганизмов, либо с выделением в ризосферу экзоферментов (Anderson et al., 1993; Schnoor et al., 1995). Кроме того, растительная масса может накапливать и разрушать токсические вещества (Shimp et al., 1993; Stomp et al., 1994).

Ризосфера представляет собой зону, находящуюся под непосредственным влиянием корней (Anderson et al., 1993). В ризосфере корневые эксудаты могут изменять pH, концентрацию кислорода, редокс-потенциал, соотношение C:N и рост микроорганизмов (Marschner, Romheld, 1996). При этом повышается как биомасса микроорганизмов, так и их метаболическая активность. Экзоферменты, выделяемые корнями, также влияют на биохимические процессы в ризосфере (Anderson et al., 1993; Schnoor et al., 1995). Поэтому биологические процессы в ризосфере характеризуются чрезвычайным разнообразием, которое определяется как генотипом растений, так и взаимодействиями с ним микроорганизмами.

Показана способность бобовых к деградации (минерализации) пестицидов и других загрязнителей почвы (табл. 12). Так в ризосферной почве сои и *Lespedeza cuneata* усилена деградация трихлорэтилена (Walton, Anderson, 1990). Минерализация диазинона и паратиона составляет 18% в ризос-

Таблица 12. Бобовые, влияющие на разложение загрязнителей почвы ризосферными бактериями (Anderson et al., 1993; Shimp et al., 1995)

Растение	Загрязнитель
Горох	Диазинон
Леспедеза	Трихлорэтилен
Фасоль	Паратион, диазинон
Соя	Трихлорэтилен, диэтилкарбаматы
Конские бобы	Сульфонамиды

фере фасоли и лишь 7% в свободной почве (Hsu, Bartha, 1979). В ризосфере гороха, содержащей диазинон, выявлены более многочисленные микробные популяции, чем в свободной почве (Anderson et al., 1993). Эксудаты бобовых стимулируют рост ризобий и экспрессию у них генов вирулентности (главы 19, 20). Эти бактерии способны к деградации различных фенольных веществ (Parke, Ornston, 1984; Tepfer et al., 1988) и доступны для генетической модификации (Fischer, Long, 1992). Могут быть созданы генно-инженерные штаммы ризобий, способные к разложению различных токсических веществ, на которых произрастают бобовые. Кроме того, возможен подбор или создание форм бобовых, способных к разложению токсинов за счет выделения экзоферментов. Корни растений выделяют широкий спектр ферментов, включающий эстеразы, пероксидазы, гидролазы, лактазы, нутрилазы и деалогеназы (Schnoor et al., 1995; Waisel et al., 1996).

Помимо ризосферных эффектов, растения могут поглощать токсические вещества посредством тока ксилемных веществ, а затем деградировать их. Так, *Brassica juncea* и *Thalspi caerulescens* могут выносить из почвы значительные количества тяжелых металлов, подсолнечник (*Helianthus annulus*) активно поглощает их из раствора (Salt et al., 1995). В нескольких лабораториях предприняты попытки трансформации растений генами, кодирующими металл-тионеины, металл-связывающие белки, и полученные растения приобретали способность к нормальному росту в присутствии тяжелых металлов (Stomp et al., 1994). Таким образом, создание растений для биоремедиации почв — дело ближайшего будущего.

Хорошо известно, что растения могут поглощать и деградировать пестициды и инсектициды, а также накапливать различные ароматические вещества (табл. 13). Сюда относятся такие опасные органические отходы как тринитротолуен, диоксин, нитробензол и пентахлорфенол (Paterson et al., 1990; Schnoor et al., 1995). Изучение устойчивости к гербицидам показало, что бобовые и другие растения могут деградировать и инактивировать органические токсины (Harrison, 1992). Такие растения могут быть получены путем отбора из природных популяций, мутагенеза и генной инженерии. В сотрудничестве с М. Sadowsky мы организовали проект, направленный на биоремедиацию атразина и повышение вклада люцерны в устойчивые агроэкосистемы (Sadowsky, Smith, 1996). Для этого люцерну трансформировали бактериальным геном *atzA* (ген атразин-галоидогидролазы), находящийся под контролем промотора вируса мозаики цветной капусты 35S (CaMV 35S), что обеспечило высокий уровень экспрессии гена во всем растении. Предполагается оценить устойчивость трансгенной люцерны к атразину, находящемуся в грунтовых водах, используемых для орошения.

В США для ремедиации намечено 32000 участков, содержащих токсичные отходы, что не включает площади населенных пунктов, в грунтовых водах которых находятся пестициды и гербициды. С использованием существующих технологий очистка этих участков потребует затрат 200 миллиардов долларов (Salt et al., 1995). В масштабе всего мира эти затраты будут во много раз больше. Использование бобовых растений для этих целей обойдется значительно дешевле и обеспечит устойчивое состояние среды.

Таблица 13. Поглощение бобовыми органических загрязнителей (Peterson et al., 1990)

Растение	Загрязнители
Люцерна	Полихлоринированные бифенилы, ароклары, ДДТ, ДДЕ, ДДД
Фасоль	Многоядерные ароматические гидрокарбоны, хлоробензены, полихлоринированные бифенилы, гексахлороциклогексаны, фенапронылы
Чечевица	Полихлоринированные бифенилы, метсульфурон
Арахис	Многоядерные ароматические гидрокарбоны, метазол, динитроанилины
Соя	Алдрин, хлордан, полихлоринированные бифенилы, ДДТ, ДДЕ, ДДД, гексахлороциклогексаны, хлоринированные фенолы, нитрофенолы, карбаматы, органофосфаты

V.C. ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ЭНЕРГИЯ И ПРОМЫШЛЕННЫЕ ПРОДУКТЫ

Получение электрической энергии из возобновляемых источников — привлекательная альтернатива использованию не возобновляемых источников (нефть, уголь, газ). В США более 1000 электростанций используют топливо. Стратегический план Департамента энергетики США (DOE) предусматривает получение 50000 мегаватт электроэнергии из биомассы в 2010 г. Считается, что этот подход наиболее перспективен с точки зрения защиты окружающей среды (DeLong et al., 1995). С учетом новых систем получения газов из биомассы доля биологически продуцируемой энергии может возрасти до 50%. Более того, эта технология в сочетании с высокоэффективными системами очистки газа позволит снизить количество золы, частиц и щелочных материалов, а также окиси углерода и окислов азота. Будет повышена эффективность использования растительного материала, непригодного для прямого сжигания.

Растительные компоненты, используемые как биотопливо, включают отходы садоводства и огородничества, опилки, скорлупу и шелуху орехов, остатки от переработки сахарного тростника и других травянистых растений, отходы древесины, заготавливаемой для производства бумаги и строевого леса (DeLong et al., 1995). Эти материалы могут использоваться на энергетических станциях, что обеспечивает существенную экономию топлива (US DOE Report, 1995). Предложена система, гарантирующая длительное снабжение топливом энергостанций (DeLong et al., 1995).

Недавно несколько организаций (USDA-ARS, DOE, Университет Миннесота, общество люцерноводов Миннесота) создали проект, направленный на использование люцерны как источника биотоплива (DeLong et al., 1995). Предполагается, что люцерна, выращиваемая на площади 100.000 га (более 2000 ферм), будет разделена на стебли и листья. Стебли будут использованы для получения биогаза, идущего на выработку энергии, тогда как листья послужат высококачественным кормом для животных.

Предполагается, что широкое использование биогаза из люцерны не приведет к усилению парникового эффекта. Выращиваемая люцерна станет дополнительным источником биологичес-

кого азота для агросистемы, состоящей из сои и кукурузы. Использование люцерны сведет к минимуму потребление удобрений, уменьшит эрозию почвы и расход агрохимикатов, а также создаст дополнительные ниши для различных организмов. Кроме того, люцерна явится дополнительным источником питательного корма. Аналогичное применение может быть предложено для клевера и быстрорастущих древеснистых бобовых.

С использованием люцерны могут быть получены различные ценные продукты. Так, люцерна легко подвергается трансформации с помощью *Agrobacterium tumefaciens* (Austin et al., 1995; Vance et al., 1995), что открывает возможности для производства альфа-амилазы и Mn-зависимой пероксидазы. Среди ценных продуктов, которые могут продуцировать другие растения, следует выделить полигидрокси-альконаты *Brassica* sp. (Poiret et al., 1995), оральные иммуногены табака и картофеля (Naq et al., 1995), антитела табака (Ma et al., 1995). Трансформация соответствующими генами люцерны и получение промышленных или лекарственных продуктов создаст возможность использования люцерны для получения биогаза (стебли), фармакологических продуктов (листья), кормов и промышленных продуктов (остатки листьев).

Производство промышленно ценных продуктов не ограничено люцерной. Многие бобовые доступны для трансформации и регенерации (Nisbet, Webb, 1990). Использование азотфиксирующих бобовых для производства промышленного и фармакологического сырья существенно снизит его стоимость, так как углерод и азот для их синтеза будут поставляться за счет возобновляемых источников.

VI. Выводы

Хотя молекулярное изучение симбиотической азотфиксации в последние годы продвинулось очень существенно, полученные знания пока еще недостаточно широко используются в практике. Более того, за последние 40 лет роль бобовых в сельскохозяйственном производстве заметно снизилась. Удвоение населения Земли, ожидаемое уже в начале 3-го тысячелетия, требует более широкого вовлечения САФ в агросистемы. Ученые должны привлечь внимание общественности к экономическим и социальным аспектам этой проблемы. Для этого необходимо подробное документирование экономии азотных удобрений, улучшения чистоты воды и почв, использования новых ценных продуктов, снижения количества применяемых пестицидов, связанное с использованием азотфиксирующих растений. Нетрадиционное использование бобовых в агросистемах может повысить их роль в экологически устойчивом сельском хозяйстве. Для повышения интенсивности САФ могут быть использованы как традиционные, так и новейшие биотехнологические подходы. САФ является наиболее важным фактором развития систем экологически сбалансированного сельского хозяйства.

VII. Благодарности

Работа выполнена в Отделе Изучения растений, Департамент сельского хозяйства США, а также на экспериментальной сельскохозяйственной станции штата Миннесота (статья N 971130030 научной серии журналов).

VIII. Литература

- Allen O.N., Allen E.K. (1981) The Leguminosae, University of Wisconsin Press, Madison.
Anderson T.A., Guthrie E.A., Walton B.T. (1993) Environ. Sci. Technol. V. 27, p. 2629-2636.
Appleby C.A. (1992) Sci. Prog. (Oxford). V. 76, p. 365-398.
Arp D.J. (1992) In: G.Stacey et al. (eds.). Biol. Nitrog. Fixat. Chapman & Hall, NY, p. 432-460.
Austin S.E., Bingham T., Matthews D.E., Shahan M.N., Will J., Burgess R.R. (1995) Euphytica. V. 85, p. 381-393.
Barnes D.K., Heichel G.H., Vance C.P., Ellis W.R. (1984) Plant and Soil. V. 82, p. 303-314.
Becker M., Ladha J.K., Ali M. (1995) Plant and Soil. V. 174, p. 181-194.
Bliss F.A. (1993) Plant and Soil. V. 152, p. 71-79.
Bockman O.-C., Kaarstad O., Lie O.H., Richards I. (1990) Agriculture and Fertilizers: Fertilizers in Perspective, Norsk Hydro, Drammen, Norway.

- Bohlool B.B., Ladha J.K., Garrity D.P., George T. (1992) *Plant and Soil*. V. 141, p. 1-11.
- Bongaarts J. (1994) *Sci. Amer.* V. 237, p. 36-42.
- Brophy L.S., Heichel G.H., Russelle M.P. (1987) *Crop Sci.* V. 27, p. 753-758.
- Buttery B.R., Park S.J., Hume D.J. (1992) *Can. J. Plant Sci.* V. 72, p. 323-349.
- Caetano-Anolles G., Gresshoff P.M. (1991) *Annu. Rev. Microb.* V. 45, p. 345-382.
- Coale F.J., Meisinger J.J., Wiebold W.J. (1985) *Plant and Soil*. V. 86, p. 357-367.
- Cregan P.B., Yaklich R.W. (1986) *Theor. Appl. Genet.* V. 72, p. 782-786.
- Danso S.K.A., Bowen G.D., Sangina N. (1992) *Plant and Soil*. V. 141, p. 171-196.
- Day D.A., Copeland L. (1991) *Plant Physiol. Biochem.* V. 29, p. 185-201.
- Dean D.R., Jacobsen M.R. (1992) In: G. Stacey et al. (eds) *Biol. Nitrog. Fixat.* Chapman & Hall, NY, p. 763-831.
- DeLong M.M., Oelka E.A., Onischak M., Schmid M.R., Wiant B.C. (1995) In: *Proc. 2-d Biomass Conf. Amer.* p. 1582-1592, Natl. Renew. Energy Lab., Dept. Energy, Publ. NREL/CP-200-8098.
- Delwiche C.C. (1970) *Sci. Amer.* V. 223, p. 136-146.
- Denarie J., Cullimore J. (1993) *Cell.* V. 74, p. 951-954.
- Denison R.F., Hunt S., Layzell D. (1992) *Plant Physiol.* V. 98, p. 894-900.
- Dobereiner J. (1987) In: G.B. Marini Bettolo (ed.) *Toward a Second Green Revolution*, Elsevier, Oxford, p. 351-365.
- Dubach M., Russelle M.P. (1994) *Agron. J.* V. 86, p. 259-266.
- Duc G., Mariotti A., Amarger N. (1988) *Plant and Soil*. V. 106, p. 269-276.
- Egli M.A., Larson R.J., Hruschka W.R., Vance C.P. (1991) *J. Exp. Bot.* V. 42, p. 969-977.
- Evans H.J., Harker A.R., Papen H., Russell S.A., Hanus F.J., Zuber M. (1987) *Annu. Rev. Microb.* V. 41, p. 335-361.
- Fischer R.F., Long S.R. (1992) *Nature*. V. 357, p. 655-660.
- Fujiata K., Oforu-Budu K.G., Ogata S. (1992) *Plant and Soil*. V. 141, p. 155-175.
- Giller K.E., Cadisch G. (1995) *Plant and Soil*. V. 174, p. 255-277.
- Golley F., Baudry J., Berry R., Bornkamm R., Dahlberg K., Jansson M., King V., Lee J., Lenz R., Sharitz R., Svedin U. (1992) *INTECOL Bull.* V. 20, p. 15-20.
- Graham P.H. (1981) *Field Crops Res.* V. 4, p. 93-112.
- Groat R.G., Vance C.P., Barnes D.K. (1984) *Crop Sci.* V. 24, p. 895-898.
- Hansen A.P., Yoneyama T., Kouchi H., Martin P. (1993) *Planta*. V. 189, p. 538-545.
- Haq T.A., Mason H.S., Clements J.D., Arntzen C.J. (1995) *Science*. V. 268, p. 714-716.
- Hardarson G. (1993) *Plant and Soil*. V. 152, p. 1-17.
- Hardarson G., Danso S.K.A. (1993) *Plant and Soil*. V. 152, p. 19-23.
- Hardy R.W.F., Holsten R.O., Jackson E.K., Burris R.C. (1968) *Plant Physiol.* V. 43, p. 1185-1207.
- Harrison H.F. (1992) *Weed Technol.* V. 6, p. 613-614.
- Hartwig U.A., Nosberger J. (1994) *Plant Physiol.* V. 161, p. 109-114.
- Heichel G.H. (1987) In: Z.R. Helsel (ed.) *Energy in Plant Nutrition and Pest Control*, Elsevier Science, Amsterdam, p. 63-80.
- Heichel G.H., Barnes D.K., Vance C.P., Sheaffer C.C. (1989) *J. Prod. Agric.* V. 2, p. 24-32.
- Herridge D.F., Danso S.K.A. (1995) *Plant and Soil*. V. 174, p. 51-82.
- Herridge D.F., Rupela O.P., Serraj R., Beck D.P. (1994) *Euphytica*. V. 73, p. 95-108.
- Hesterman O.B., Russelle M.P., Sheaffer C.C., Heichel G.H. (1987) *Agron. J.* V. 79, p. 726-731.
- Hirsch A.M. (1992) *New Phytol.* V. 122, p. 211-237.
- Hsu T.S., Bartha R. (1979) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 37, p. 36-41.
- Hunt S., Layzell D.B. (1993) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* V. 44, p. 483-511.
- Jacobsen-Lyon K., Jensen E.O., Jorgensen J.-E., Marcker K.A., Peacock W.J., Dennis E.S. (1995) *Plant Cell*. V. 7, p. 213-223.
- Jessen D.L., Barnes D.K., Vance C.P., Heichel G.H. (1987) *Crop Sci.* V. 27, p. 627-631.
- Jessen D.L., Barnes D.K., Vance C.P. (1988) *Crop Sci.* V. 28, p. 18-22.
- Kapulnik Y., Joseph C.M., Phillips D.A. (1987) *Plant Physiol.* V. 84, p. 1193-1196.
- Kinzig A.P., Socolow R.H. (1994) *Physics Today*. V. 47, p. 24-35.
- Ladha J.K., Peoples M.B. (1995) *Manag. Biol. Nitrog. Fixat. Develop. More Product. Sustain. Agricult. Systems*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht.
- Layzell D.B., Moloney A.H.M. (1994) In: K.J. Boote et al. (eds.) *Physiol. Determin. Crop Yield*, Amer. Soc. Agron. Madison, p. 311-334.
- Ledgard S.F., Steele K.W. (1992) *Plant and Soil*. V. 141, p. 137-152.
- Lory J.A., Russelle M.P., Heichel G.H. (1992) *Agron. J.* V. 84, p. 1023-1040.
- McDermott T.R., Graham P.H. (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 55, p. 2493-2498.
- Ma J. K.-C., Hiatt A., Hem M., Vine N.D., Wang F., Stabina P., van Dolleweerd C., Mortov K., Lehner T. (1995) *Science*. V. 268, p. 716-719.
- Marschner H., Romheld V. (1996) In: Y. Waisel et al. (eds.) *Plant Roots: The Hidden Half*. Marcel Dekker, Inc. NY, p. 581-606.
- Masterson C.L., Sherwood M.T. (1978) *Plant and Soil*. V. 49, p. 421-426.
- Maxwell C.A., Vance C.P., Heichel G.H., Stade S. (1984) *Crop Sci.* V. 24, p. 257-264.
- Merrick M.J. (1992) In: G. Stacey R.H. et al. (eds.) *Biol. Nitrog. Fixat.* Chapman & Hall, NY, p. 835-876.
- Minchin F.R., Witty J.F., Mytton L.R. (1994) *Plant and Soil*. V. 158, p. 163-167.

- Murphy P.M. (1986) *Plant and Soil*. V. 95, p. 399-409.
- Newbould P. (1989) *Plant and Soil*. V. 115, p. 297-311.
- Newton W.E. (1993) In: R. Palacios et al. (eds.). *New Horizons in Nitrogen Fixation*, Kluwer, Dordrecht, p. 5-17.
- Nisbet G.S., Webb K.J. (1990) In: Y.P.S. Bajaj (ed.). *Biotechn. Agric. Forestry*, Springer-Verlag, Berlin, p. 38-48.
- Nutman P.S. (1976) In: P.S. Nutman (ed.). *Symb. Nitrog. Fixat. Plants*, Camb. Univ. Press, p. 211-237.
- Parke D., Ornston L.N. (1984) *J. Gen. Microbiol.* V. 130, p. 1743-1747.
- Paterson S., Mackay D., Tam D., Shiu W.Y. (1990) *Chemosphere*. V. 21, p. 297-331.
- Peoples M.B., Craswell E.T. (1992) *Plant and Soil*. V. 141, p. 13-39.
- Peoples M.B., Herridge D.F., Ladha J.K. (1995a) *Plant and Soil*. V. 174, p. 3-28.
- Peoples M.B., Ladha J.K., Herridge D.F. (1995b) *Plant and Soil*. V. 174, p. 83-102.
- Peterson T.A., Russelle M.P. (1991) *J. Soil Water Conserv.* V. 46, p. 229-233.
- Phillips D.A. (1980) *Annu. Rev. Plant Physiol.* V. 11, p. 29-49.
- Phillips D.A., Newell D.A., Hassell S.A., Felling C.E. (1976) *Amer. J. Bot.* V. 63, p. 356-362.
- Phillips D.A., Teuber L.R. (1992) In: G. Stacey et al. (eds.) *Biol. Nitrog. Fixat.* Chapman & Hall, NY, p. 625-645.
- Poirer Y., Nwirth C., Somerville C. (1995) *Bio/Technology*. V. 13, p. 142-149.
- Rosas J.C., Bliss F.A. (1986) *Hort. Set.* V. 21, p. 287-289.
- Rosendahl L., Vance C.P., Miller S.S., Jacobsen E. (1989) *Physiol. Plant*. V. 77, p. 606-612.
- Rosendahl L., Vance C.P., Pedersen W.B. (1990) *Plant Physiol.* V. 93, p. 12-19.
- Rumjanek N.G., Dobert R.C., Vanberkum P., Triplett E.W. (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 59, p. 4371-4373.
- Russelle M.P. (1996) In: R.E. Joost, C.A. Roberts (eds.). *Nutr. Cycl. Forage Syst., Potash and Phosph. Inst. Found. Agron. Res.*, Manhattan, Kansas, p. 125-166.
- Sadowsky M.J., Smith D.R. (1996) In: G. Stacey et al. (eds.). *Proc. 8th Intern. Congr. Mol. Plant-Microbe Interact.* Kluwer Acad. Publ. Dordrecht (in press).
- Salt D.E., Blaylock M., Kumar N.P.B.A., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I., Raskin I. (1995) *Biotechnology*. V. 13, p. 468-474.
- Sanginga N., Vanlauwe B., Danso S.K.A. (1995) *Plant and Soil*. V. 174, p. 119-141.
- Schnoor J.L., Licht L.A., McCutcheon S.C., Urolfe N.L., Carreira L.H. (1995) *Envir. Sci Technol.* V. 7, p. 318-323.
- Schubert K.R. (1981) *Amer. Soc. Plant Physiol.* Rockville, MD.
- Sheehy J.E. (1987) *Crit. Rev. Plant Sci.* V. 5, p. 121-159.
- Shimp J.F., Tracy J.E., Davis L.C., Lee E., Huang W., Erickson L.E., Schnoor J.L. (1993) *Crit. Rev. Envir. Sci. Technol.* V. 23, p. 41-57.
- Sprent J.I. (1984) In: M.B. Wilkins (ed.). *Adv. Plant Physiol.* Pitman, London, p. 249-276.
- Stomp A.M., Han K.H., Wilbert S., Gordon M.P., Cunningham S.D. (1994) *Ann. NY Acad. Sci.* V. 721, p. 481-491.
- Ta T.C., Faris M.A. (1987) *Agron. J.* V. 79, p. 820-824.
- Taylor E.R., Nie X.Z., MacGregor A.W., Hill R.D. (1994) *Plant Mol. Biol.* V. 24, p. 853-862.
- Tepfer D., Goldmann A., Pamboukdyian N., Maille M., Lepingle A., Chevalier D., Denarie J., Rosenberg C. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 1153-1157.
- Teuber L.R., Levin R.P., Sweeney T.C., Phillips D.A. (1984) *Crop Sci.* V. 24, p. 553-558.
- Teuber L.R., Phillips D.A. (1988) *Crop Sci.* V. 28, p. 599-604.
- Thomas R.J. (1995) *Plant and Soil*. V. 158, p. 103-118.
- Tjepkema J.D., Yocum C.S. (1974) *Planta*. V. 119, p. 351-360.
- US Department of Energy (1995) *Biomass Power Prog. Overview*, DOE/GO-10095-089, p. 12.
- Vance C.P. (1996) In: Y. Waisel et al. (eds.). *Plant Roots: The Hidden Half*, Marcel Dekker, Inc., NY, p. 723-756.
- Vance C.P., Graham P.H. (1995) In: I.A. Tikhonovich et al. (eds.). *Nitrog. Fixat. Fundam. Applic.* Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, p. 77-86.
- Vance C.P., Heichel G.H. (1991) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* V. 42, p. 373-392.
- Vance C.P., Heichel G.H., Barnes D.K., Bryan J.W., Johnson L.E. (1979) *Plant Physiol.* V. 64, p. 1-8.
- Vance C.P., Miller S.S., Gregerson R.G., Samac D.A., Robinson D.L., Gantt J.S. (1995) *Plant J.* V. 8, p. 345-358.
- Vessey J.K. (1994) *Plant and Soil*. V. 158, p. 151-162.
- Waggoner P.E. (1994) *Counc. Agric. Sci. Technol. Task Force Report 121*, Ames, Iowa.
- Waisel Y., Eschel A., Kafkafi U. (1996) *Plant Roots: The Hidden Half*, Marcel Dekker, Inc., NY.
- Walton B.T., Anderson T.A. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* V. 56, p. 1012-1016.
- Wani S.P., Rupela O.P., Lee K.K. (1995) *Plant and Soil*. V. 174, p. 29-50.
- West C.P., Mallarino A.P. (1996) In: R.E. Joost, C.A. Roberts (eds.). *Nutr. Cycl. Forage Syst. Potash and Phosphate Inst. Found. Agron. Res.* Manhattan, Kansas, p. 167-175.
- Zanetti S., Hartwig U.A., Luscher A., Hebeisen T., Hendrey G.R., Blum H., Nosberger J. (1996) *Plant Physiol.* in press.

Список авторов

- Батут Ж. (Batut Jacques)** Глава 23. Laboratoire de Biologie Moleculaire des Relations Plantes-Microorganismes, CNRS INRA, BP 27 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France.
- Беккер А. (Becker Anke)** Глава 6. Lehrstuhl für Genetik, Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld, Postfach 100131, 33501 Bielefeld, Germany.
- Беркум ван П. (van Berkum Peter)** Глава 1. Soybean and Alfalfa Research Laboratory, USDA, ARS, HH-19, Bldg. 011, BARC-West, 10300 Baltimore Blvd., Beltsville, Maryland 20705, USA.
- Биннс А.Н. (Binns Andrew N.)** Глава 12. Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, 19104-6018, USA.
- Бисселинг Т. (Bisseling Ton)** Главы 18 и 21. Department of Molecular Biology, Agricultural University, Dreijenlaan 3, 6703 HA, Wageningen, The Netherlands.
- Боистард П. (Boistard Pierre)** Глава 23. Laboratoire de Biologie Moleculaire des Relations Plantes-Microorganismes, CNRS INRA, BP 27 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France.
- Боттерман Й. (Botterman Johan)** Глава 17. Plant Genetic Systems, Jozef Plateastraat 22, B-9000 Gent, Belgium.
- Бревин Н. (Brewin Nicholas J.)** Главы 18 и 22. Department of Genetics, John Innes Centre, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, Great Britain.
- Бридвелд М. (Breedveld Michael W.)** Глава 5. Groningen University, Centre for Biology, Department of Microbiology, Kerklaan 30, 9751 NN Haren, The Netherlands.
- Вэнс К. (Vance Carroll P.)** Глава 26. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Plant Science Research Unit, Department of Agronomy and Plant Genetics, University of Minnesota, St. Paul, MN, 55108, USA.
- Гейгер О. (Geiger Otto)** Глава 4. Technische Universität Berlin, Institut für Biotechnologie, FG Technische Biochemie, Seestraße 13, D-13353 Berlin, Germany.
- Грэм П. (Graham Peter H.)** Глава 8. Department of Soil, Water, and Climate, University of Minnesota, St. Paul, MN, 55108, USA.
- Дас А. (Das Anath)** Глава 13. Department of Biochemistry and Plant Molecular Genetics Institute, University of Minnesota, 1479 Gortner Avenue, St. Paul, MN 55108, USA.
- Денг В. (Deng Wanyin)** Глава 16. Department of Microbiology, University of Washington, Box 357242, Seattle, WA 98195-7242, USA.
- Дессо И. (Dessaux Yves)** Глава 9. CNRS, Institut des Sciences Vegetales, Batiment 23, Gif-sur-Yvette, France.
- Джонсон Т.М. (Johnson Tonny M.)** Глава 13. Department of Biochemistry and Plant Molecular Genetics Institute, University of Minnesota, 1479 Gortner Avenue, St. Paul, MN 55108, USA.
- Доуни Дж. А. (Downie J. Allan)** Глава 20. John Innes Centre, Colney Lane, Norwich, NR4 7UH, Great Britain.
- Д'Халльон К. (D'Halluin Kathleen)** Глава 17. Plant Genetic Systems, Jozef Plateastraat 22, B-9000 Gent, Belgium.
- Кайн Я. (Kijne Jan W.)** Глава 11. Leiden University, Institute of Molecular Plant Sciences, Clusius Laboratory, Wassenaarseweg 64, 2333 AL Leiden, The Netherlands.

- Камински П. (Kaminski Pierre A.)** Глава 23. Unite de Physiologie Cellulaire, Departement des Biotechnologies URA1300. Institut Pasteur. 28, rue du Dr Roux. 75724 Paris Cedex 15, France.
- Кан М. (Kahn Michael L.)** Глава 24. Department of Microbiology, Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman WA 99164-6340, USA.
- Канненберг Э. (Kannenberg Elmar L.)** Глава 7. Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, 220 Riverbend Rd., Athens, GA 30602, USA.
- Карлсон Р. (Carlson Russell W.)** Глава 7. Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, 220 Riverbend Rd., Athens, GA 30602, USA.
- Квиспел А. (Quispel Anton)** Глава 25. Leiden University, Institute of Molecular Plant Sciences, Clusius Laboratory, Wassenaarseweg 64, 2333 AL Leiden, The Netherlands.
- Кондорози А. (Kondorosi Adam)** Редактор. CNRS, Institute des Sciences Vegetales, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette, Cedex, France.
- Кондорози Е. (Kondorosi Eva)** Глава 19. CNRS, Institute des Sciences Vegetales, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette, Cedex, France.
- Костантино П. (Costantino Paolo)** Глава 12. Dip. Genetica e Biologia Molecolare, University «La Sapienza» Rome, P. le A. Moro 5, 00185 Roma, Italy.
- Круз Ф. де ла (de la Cruz Fernando)** Глава 14. Departamento de Biologia Molecular, Universidad de Cantabria, C. Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain.
- Ланка Э. (Lanka Erich)** Глава 14. Max-Planck-Institut fur Molekulare Genetik, Dahlem, D-14195 Berlin, Germany.
- Лютгенберг Б. (Lugtenberg Ben J.J.)** Глава 3. Leiden University, Institute of Molecular Plant Sciences, Clusius Laboratory, Wassenaarseweg 64, 2333 AL Leiden, The Netherlands.
- Макдермотт Т.Р. (McDermott Tim R.)** Глава 24. Department of Plant, Soil and Environmental Science, Montana State University, Bozeman, Montana 59717-0312, USA.
- Марфи П.Дж. (Murphy Peter J.)** Глава 9. Department of Crop Protection, University of Adelaide, Glen Osmond, South-Australia.
- Маттис Э. (Matthysse Ann G.)** Глава 11. Department of Biology, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599-3280, USA.
- Миллер К. Дж. (Miller Karen J.)** Глава 5. Department of Food Science, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania 16802, USA.
- Нестер Ю. (Nester Eugene W.)** Глава 16. Department of Microbiology, University of Washington, Box 357242, Seattle, WA 98195-7242, USA.
- Пети А. (Petit Annik)** Глава 9. Institut des Sciences Vegetales, Batiment 23, CNRS, Gif-sur-Yvette, France.
- Пюлер А. (Puhler Alfred)** Глава 6. Lehrstuhl fur Genetik, Fakultat fur Biologie, Universitat Bielefeld, Postfach 100131, 33501 Bielefeld, Germany.
- Реус Б. (Reuhs Bradley L.)** Глава 7. Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, 220 Riverbend Rd., Athens, GA 30602, USA.
- Росси Л. (Rossi Luca)** Глава 15. Friedrich Miescher-Institut, P.O.Box 2543, CH4002 Basel, Switzerland.

- Садовски М. (Sadowsky Michael J.)** Глава 8. Department of Soil, Water, and Climate, University of Minnesota, St. Paul, MN, 55108, USA.
- Спайнк Г. (Spaink Herman P.)** Редактор, глава 18. Leiden University, Institute of Molecular Plant Sciences, Clusius Laboratory, Wassenaarseweg 64, 2333 AL Leiden, The Netherlands.
- Тинланд Б. (Tinland Bruno)** Глава 15. Swiss Federal Institute of Technology, Institute of Plant Sciences, ETH-Zurich CH-8092, Zurich, Switzerland.
- Удварди М.К. (Udvardi Michael K.)** Глава 24. Division of Biochemistry and Molecular Biology, Australian National University, Faculty of Science, Canberra ACT 0200, Australia.
- Фарранд С.К. (Farrand Stephen K.)** Главы 9 и 10. Departments of Microbiology and Plant Pathology, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL, 61801, USA.
- Филлипс Д. (Phillips Donald A.)** Глава 19. Department of Agronomy, University of California, Davis, CA 95616, USA.
- Финан Т. (Finan Turlough M.)** Глава 2. Department of Biology, McMaster University, 1280 Main Street West, Hamilton ON L8S 4K1, Canada.
- Форсберг С. (Forsberg Scott)** Глава 7. Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, 220 Riverbend Rd., Athens, GA 30602, USA.
- Хадри А.-Е. (Hadri Az-Eddine)** Главы 18 и 22. Department of Molecular Biology, Agricultural University, Dreijenlaan 3, 6703 HA, Wageningen, The Netherlands.
- Хайнес М. (Hynes Michael F.)** Глава 2. Department of Biological Sciences, University of Calgary, 2500 University Drive NW, Calgary, Alberta, T2N 1N4, Canada.
- Хон Б. (Hohn Barbara)** Глава 15. Friedrich Miescher-Institut, P.O.Box 2543, CH4002 Basel, Switzerland.
- Хукас П. (Hooykaas Paul J.J.)** Редактор. Leiden University, Institute of Molecular Plant Sciences, Clusius Laboratory, Wassenaarseweg 64, 2333 AL Leiden, The Netherlands.
- Шламан Х. (Schlaman Helmi R.M.)** Глава 19. Leiden University, Institute of Molecular Plant Sciences, Clusius Laboratory, Wassenaarseweg 64, 2333 AL Leiden, The Netherlands.
- Эрдли Б. (Eardly Bertrand D.)** Глава 1. Department of Biology, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA.

Rhizobiaceae

молекулярная биология бактерий взаимодействующих с растениями

Предлагаемая книга содержит подробный обзор данных по молекулярной биологии и генетике бактерий сем. *Rhizobiaceae*. Эти симбиотические бактерии привлекают внимание исследователей благодаря способности взаимодействовать с растениями, модифицируя их развитие. Ризобии образуют на корнях или стеблях бобовых клубеньки, находясь в которых фиксируют атмосферный азот и передают его хозяину. Препараты, содержащие эти бактерии, находят все более широкое применение в сельском хозяйстве. В отличие от ризобий, агробактерии являются паразитами растений, вызывая их опухольную трансформацию. Однако и этот процесс нашел применение в практике, так как агробактерии передают в растительные клетки свою ДНК, что открывает широкие возможности для изучения и модификации растительного генома. Бактерии *Rhizobiaceae* предоставляют ученым уникальные возможности для выяснения молекулярных основ симбиоза организмов, находящихся на разных уровнях биологической организации. Ризобии и агробактерии являются превосходными моделями для анализа сигнальных процессов, морфогенеза и клеточной дифференцировки, регуляции генов и метаболической интеграции партнеров — феноменов, лежащих в основе всех симбиотических взаимодействий. Способность этих бактерий к обмену генами с неродственными микробами и даже с растениями-хозяевами позволяет нам приблизиться к разгадке многих тайн симбиотической эволюции, в том числе — к раскрытию механизмов становления эукариотического уровня организации клеток. Огромное общебиологическое и хозяйственное значение бактерий *Rhizobiaceae* позволяет рекомендовать эту информативную и хорошо иллюстрированную книгу не только для широкого круга специалистов (молекулярных биологов, генетиков, биохимиков, микробиологов, экологов, физиологов растений, почвоведов), но и для студентов высших учебных заведений соответствующих профилей.